

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Barbora Číhařová

Studium účinku modifikace virových částic polyhistidinem na jejich intracelulární lokalizaci a dopravu
genů do jádra

*Effect of polyhistidine modification of viral particles on their intracellular localization and gene delivery
to the nucleus*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26.4. 2021

.....
Barbora Číhařová

Poděkování

Moc ráda bych poděkovala všem, kteří mě během mého studia a při psaní diplomové práce podporovali, věnovali mi svůj čas a vytvářeli příjemné prostředí pro dokončení tohoto projektu. Jmenovitě moc děkuji mé školitelce paní doktorce Haně Španielové za inspirativní přístup k vědě, trpělivost, spoustu rad a především za její čas strávený nad plánováním tohoto projektu a následnou kontrolou diplomové práce. Také děkuji magistře Janě Váňové, která zajišťuje každodenní úsměv všem členům laboratoře, za neuvěřitelnou trpělivost, zaučení v laboratoři a neocenitelnou pomoc v průběhu celého studia. Moc děkuji také Mgr. et Mgr. Alžbětě Hejtmánkové za řadu důležitých rad, přátelský přístup a zaučení při práci s elektronovým mikroskopem. Paní docentce Forstové děkuji za přijetí do laboratoře a možnost naučit se techniky molekulární biologie. Velký dík také patří všem současným i bývalým členům laboratoře, kteří vytvářeli přátelské prostředí, ve kterém byla radost pracovat.

Mnohokrát děkuji mé rodině za nesmírnou podporu, poskytnutí zázemí a pochopení po celou dobu studia. V neposlední řadě moc děkuji Bc. Danielu Žuchovi za podporu nejen při psaní diplomové práce, ale i za pomoc se statistickým vyhodnocením dat a zpracováním grafů.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky (GAČR 17-11397S).

Abstrakt

Virové vektory odvozené od myšího polyomaviru jsou vhodným nástrojem pro studium přístupů, které se používají v nanomedicině pro dosažení efektivního přenosu terapeutických látek do buněk, do míst jejich cílového účinku. Vektory odvozené od myšího polyomaviru jsou stejně jako mnohé nanočástice často zachyceny v endosomu a následně degradovány. Diplomová práce se proto zabývá možnostmi modifikace takovýchto vektorů, která by zajistila efektivnější přenos do cytosolu či až do jádra. Tato práce přinesla poznatky o zefektivnění přenosu částic modifikovaných pomocí membránově aktivních peptidů kovalentně vázaných ke kapsidovému proteinu VP3 lokalizovanému uvnitř částice. Pro kovalentní genetické modifikace VP3 proteinu byl využit polyhistidinový peptid KH27K a jeho potenciál ke zvýšení efektivity transdukce modifikovaných virových částic byl srovnáván s modifikací pomocí peptidů LAH4 nebo R8. Výsledky transdukčního testu ukázaly, že kovalentně navázaný peptid R8 je schopen proti nemodifikovaným částicím několikanásobně zvýšit účinnost dopravy do jádra. Modifikace LAH4 se naopak ukázala být účinnou pouze v případě, kdy byly částice s LAH4 asociovány pouze nekovalentně, v takovém případě byl přenos do jádra proti kontrolním částicím až 40- násobně efektivnější. Modifikace polyhistidinem, který by měl dle literatury zlepšit únik endocytovaného materiálu z endosomu pomocí tzv. efektu protonové houby, odhalila, že u částic modifikovaných KH27K k přenosu do cytosolu skutečně dochází. Práce tak svými výsledky přispěla k lepšímu pochopení účinku vybraných peptidů penetrujících membrány na transport částic.

Klíčová slova: polyomavirus, VLP, únik z endosomu, polyhistidin, doprava genů, peptidy penetrující membrány, CPP

Abstract

Viral vectors derived from mouse polyomavirus are a convenient tool for studying the targeted delivery of therapeutical agents into the cells and cellular organelles. Vectors derived from mouse polyomavirus face difficulties similar to other nanoparticles, as they often end up trapped inside an endosome where they are subsequently degraded. This diploma explored the potential of vector modifications, which have the potential to make the transport to the nucleus or cytosol more effective. This work had particularly focused on increasing the transduction efficiency by modifying particle's internally localized VP3 capsid protein with covalently bound membrane-penetrating peptides. Primary covalent genetic modification to the VP3 protein was the polyhistidine peptide KH27K. Its potential of improving the transduction effectivity was compared with two other peptide modifications – LAH4 and R8. The results of the transduction test showed that covalently bound R8 peptide had many-fold improved the transport to the nucleus when compared to the unmodified particles. The modification with LAH4 peptide had been regarded more effective only when was associated with the particles non-covalently. In such scenario the transduction efficiency rose 40-times when compared with unmodified particles. Polyhistidine modification, which should aid the endosomal escape via the proton sponge mechanism, had indeed enabled particles to escape to the cytosol. To conclude, this work elucidates the effect cell-penetrating peptides have on a transport of particles.

Keywords: polyomavirus, VLP, endosome escape, polyhistidine, gene delivery, cell-penetrating peptides

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1	Polyomaviry	13
2.2	Myší polyomavirus	13
2.2.1	Struktura virové částice.....	15
2.2.2	Vstup viru do buňky a následný transport	17
2.3	Viru podobné částice a jejich možné využití.....	18
2.4	VLP a pseudoviriony odvozené od myšího polyomaviru	19
2.5	Problém degradace a uvěznění materiálu v endosomu	21
2.6	Peptidy penetrující membrány.....	22
2.6.1	Peptidy bohaté na arginin	24
2.6.2	Peptidy bohaté na histidin.....	24
2.6.3	LAH4	26
2.7	Endosomální únik.....	26
3	CÍLE PRÁCE	30
4	MATERIÁL A METODY.....	31
4.1	Materiál.....	31
4.1.1	Antibiotika.....	31
4.1.2	Buněčné kultury.....	31
4.1.3	Často používané roztoky a chemikálie.....	32
4.1.4	Enzymy	34
4.1.5	Expresní systémy	34
4.1.6	Komerční soupravy a produkty.....	34
4.1.7	Kultivační média.....	35
4.1.8	Markery molekulových hmotností	37
4.1.9	Peptidy penetrující membrány.....	38
4.1.10	Primery	38
4.1.11	Protilátky.....	38
4.1.12	Software.....	39
4.1.13	Vektory.....	40
4.1.14	Virová inokula.....	41
4.2	Metody	41

4.2.1	Sterilizace.....	41
4.2.2	Práce s bakteriálními liniemi	41
4.2.3	Práce se savčími a hmyzími buněčnými liniemi.....	42
4.2.4	Práce s DNA	44
4.2.5	Práce s proteiny a jejich charakterizace.....	47
4.2.6	Izolace částic odvozených od viru	50
4.2.7	Práce s částicemi odvozenými od viru	52
5	VÝSLEDKY	57
5.1	Uspořádání experimentálního systému	58
5.2	Příprava, izolace a charakterizace plasmidových vektorů	61
5.3	Produkce virpotérů-in a pseudovirionů v savčí buněčné linii 293TT.....	65
5.3.1	Izolace VP-in a PsV pomocí ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl.....	68
5.3.2	Izolace VP-in a PsV pomocí ultracentrifugace v gradientu jodixanolu	70
5.4	Produkce a izolace VLP pomocí ultracentrifugace v gradientu CsCl	71
5.5	Charakterizace virpotérů-in a pseudovirionů.....	74
5.5.1	Stanovení proteinové koncentrace částic.....	74
5.5.2	Vizualizace částic pomocí transmisní elektronové mikroskopie.....	75
5.5.3	Analýza izolovaných částic pomocí SDS-PAGE v gradientovém gelu a detekce proteinů. 78	
5.5.4	Kvantifikace zabalené plasmidové DNA uvnitř částic	85
5.6	Luciferázový test.....	86
5.7	Mapování intracelulární lokalizace virových částic pomocí frakcionace	89
6	DISKUZE	98
7	SOUHRN	110
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	112
9	PŘÍLOHY PRÁCE.....	124

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK	Aminokyselina
BSM	Bezsérové médium
CPP	Peptid penetrující membrány
ddH ₂ O	Destilovaná a demineralizovaná voda
dH ₂ O	Destilovaná voda
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ER	Endoplasmatické retikulum
FBS	Fetální bovinní sérum
GAPDH	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
HD	Hydrofobní doména
MPyV	Myší polyomavirus
NP	Nanočástice
pDNA	plasmidová DNA
Pdots	Polymerní tečky
PHP	Polyhistidinový peptid
PM	Petriho miska
PsV	Pseudoviriony
RLU	Relativní luciferázová jednotka
RNA	Ribonukleová kyselina
SV40	Simian virus 40
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
VLP	Viru podobná částice
VP1	Virový protein 1
VP2	Virový protein 2
VP3	Virový protein 3
VP-in	Virportér-in
wt	Divoký typ viru

1 ÚVOD

Viry jsou intracelulární obligátní parazité, jež byly po miliony let v průběhu evoluce optimalizovány k co nejúčinnějšímu vstupu a následnému pomnožení v hostiteli. Těto optimalizace však lze využít v náš prospěch, respektive pro potřeby doručování léčiv do specifických buněčných typů. V posledních letech jsou detailně studovány možnosti léčby širokého spektra nemocí s využitím dopravy léčiva či terapeutické DNA či RNA asociované s nevirovými vektory do buněk. Nicméně syntetické vektory se v lidském těle potýkají s celou řadou překážek, jako jsou sérové proteiny v krvi, nízká specifita a malá úspěšnost internalizace do buňky, čemuž viry, díky postupné optimalizaci, již dokáží do určité míry předejít. Zároveň lze produkovat viru podobné částice, které si zachovávají buněčnou specifitu, nicméně jsou bezpečné, protože neobsahují svou genetickou informaci.

Jedním z možných virových vektorů jsou částice odvozené od myšího polyomaviru (MPyV), které byly studovány v této práci a představují přirozené nanočástice (NP, z anglického *nanoparticle*) velikostně a tvarem srovnatelné se syntetickými nanočásticemi. Polyomaviry jsou malé neobalené viry, jejichž genetická informace ve formě DNA je společně s minoritními kapsidovými proteiny VP2 a VP3 ukryta v jednoduché kapsidě tvořené proteinem VP1. VP1 protein je zodpovědný jak za složení virové kapsidy, tak také za interakci s receptorem na povrchu buňky a následnou internalizaci dovnitř buňky. Proteiny VP2 a VP3 jsou poté pravděpodobně zapojeny do úniku viru z endoplasmatického retikula, kam je částice přenesena z endosomálního vakuolu po vstupu do buňky. Jednoduchá struktura, možnost za optimálních podmínek samovolného složení částice pouze z jediného proteinu VP1 a schopnost nespecificky zabalit DNA o velikosti virového genomu (tedy přibližně 5,3 kbp) činí viru podobné částice odvozené od myšího polyomaviru slibným kandidátem pro využití jakožto vektorů v genové terapii. Velkou výhodou je navíc možnost levné produkce v expresních systémech a snadná optimalizace a modifikace viru podobných částic.

V laboratoři virologie je v posledních letech mimo jiné kladen důraz na studium modifikace částic odvozených od MPyV pomocí peptidů penetrujících membrány (CPP, z anglického *cell penetrating peptide*) za účelem zvýšení efektivity vstupu do buňky a následné transdukce do jádra. CPP jsou krátké peptidy lišící se strukturou a nábojem, nicméně jejich společným znakem je schopnost narušovat membrány, a tím potenciálně zvyšovat internalizaci do buňky a následně zprostředkovat únik z endolysosomálního vakuolu. Pro tyto vlastnosti a možnost asociace s jinými molekulami jako jsou nanočástice virové i nevirové či DNA, RNA nebo proteiny, kterým poté napomáhají v internalizační dráze, jsou CPP v posledních letech velmi rozsáhle studovány.

Cílem diplomové práce bylo modifikovat VP3 protein třemi různými peptidy: peptidem KH27K, který by měl zprostředkovat únik z endosomu, pomocí peptidu LAH4, který se hojně využívá jako transdukční činidlo, a peptidem R8, který je silně kationický a také má potenciál zefektivnit transdukci částic odvozených od MPyV. Cílem diplomové práce bylo charakterizovat jednotlivé částice a ověřit, zda je možné je detekovat v cytosolu a zda disponují zvýšenou transdukční aktivitou v porovnání s částicemi nemodifikovanými.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Polyomaviry

Polyomaviry, patřící do čeledi virů *Polyomaviridae*, jsou malé neobalené tumorogenní viry infikující především savce, ptáky a ryby (Buck et al., 2016; Dill et al., 2016), ale v posledních letech byly polyomavirové sekvence nalezeny i u plazů a členovců (Ehlers et al., 2019). Mezi typické zástupce patří myší polyomavirus (MPyV), lidské BK a JC viry a polyomavirus Merkelových buněk (MCPyV), který byl poměrně nedávno spojen s karcinomem Merkelových buněk (Feng et al., 2008). V lidské populaci mají BK a JC viry vysokou prevalenci, protilátky v krvi proti BK viru byly detekovány až u 80% zdravých jedinců a u 40-60% v případě polyomaviru Merkelových buněk (Kean et al., 2009; Viscidi et al., 2011). Zatímco infekce těmito viry bývá u zdravých jedinců obvykle asymptomatická, u jedinců s oslabenou imunitou může vést k propuknutí projevů onemocnění. U JC viru je rizikem rozvoj progresivní multifokální leukoencefalopatie (Hirsch et al., 2013; Padgett et al., 1971), u BK viru je riziko spojené s rozvojem nefropatie, která u jedinců po transplantaci ledvin může vést k selhání transplantovaného orgánu (Hirsch et al., 2002), případně rozvoj karcinomu Merkelových buněk u MCPyV (Feng et al., 2008).

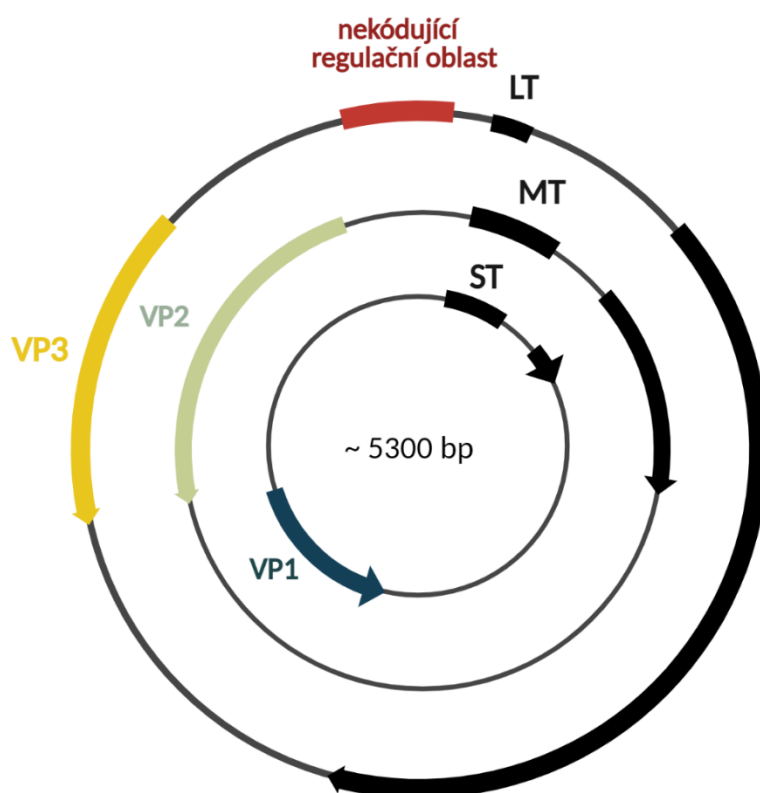
Mezi modelové viry z čeledi *Polyomaviridae*, které jsou nejvíce používány a z hlediska molekulární biologie nejpečlivěji studovány, patří především virus SV40 (z anglického *simian vacuolating virus 40*) a myší polyomavirus. Sv40 je virus infikující především primáty, ale jeho sekvence byly nalezeny i v lidských buňkách. Naopak sekvence MPyV v lidských buňkách zatím detekovány nebyly a lze předpokládat, že proti MPyV nejsou v lidské populaci vytvořené protilátky, což ho společně s dalšími výhodami, jako je možná modifikace virových proteinů nebo možnost zabalení terapeutické látky činí ideálním kandidátem pro prostudování možností využití v oblasti nanomedicíny.

2.2 Myší polyomavirus

V této diplomové práci jsou v experimentální části využívány především částice odvozené od myšího polyomaviru, který byl v roce 1953 prvním objeveným virem z čeledi *Polyomaviridae* (Gross, 1953).

MPyV je virus, jehož genom je tvořen kruhovou dvouvláknovou DNA o velikosti přibližně 5,3 kilopárů bází (kbp) a s kapsidou o průměrné velikosti 45 nm. Genom je v komplexu s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4 (Crémisi et al., 1976), spolu s nimiž tvoří minichromozom (Gourlie et al., 1981; Krauss & Benbow, 1981), uložen ve virové kapsidě a rozdělen na tři specifické části – na oblast kódující časné geny, oblast kódující pozdní geny a oblast regulační. Nekódující regulační oblast obsahuje replikační

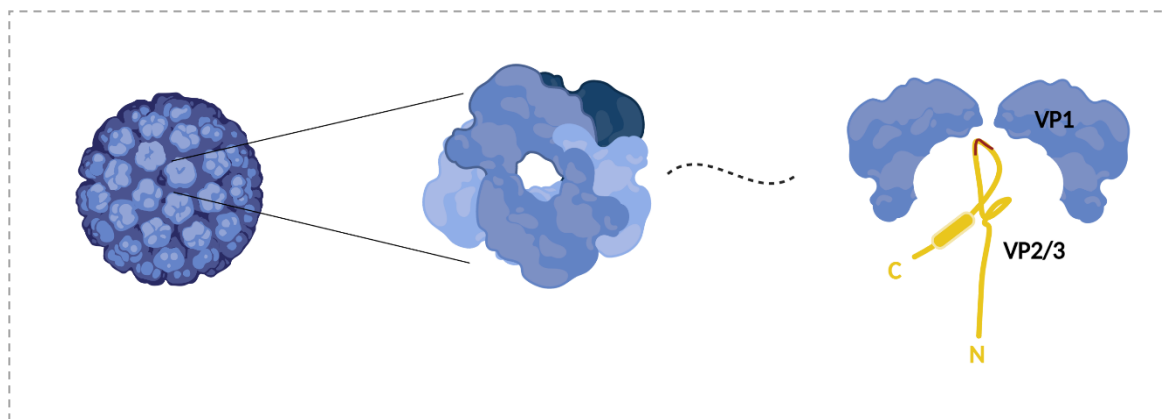
počátek, enhancery a promotory. Oblast časných genů je částí, kde jsou kódovány T antigeny – malý (ST antigen, z anglického *small tumor antigen*), střední (MT antigen, z anglického *middle tumor antigen*) a velký (LT antigen, z anglického *large tumor antigen*), které se podílejí jak na replikaci virového genomu, regulaci transkripce proteinů virových i buněčných, ale i na deregulaci buněčného cyklu (J. A. Borowiec & Hurwitz, 1988; M. A. J. Borowiec et al., 1990; Cho et al., 2019; Stahl et al., 1986). Pozdní oblast genomu kóduje geny pro 3 strukturní proteiny, tedy pro majoritní kapsidový protein VP1 a minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3. K replikaci MPyV genomu dochází v buněčném jádře ve specifických oblastech, zvaných virová replikační centra, kde se shlukují T antigeny (de Castro et al., 2021; Peters et al., 2020). Transkripce probíhá obousměrně, přičemž časně transkripty, exprimované po vstupu viru do buňky a pozdní transkripty, jež jsou exprimovány v pozdní fázi infekce po replikaci virového genomu, jsou přepisovány z opačných vláken DNA.



Obrázek 1: **Schéma genomu myšího polyomaviru.** Červeně vyznačena nekódující regulační oblast, vpravo poté černě geny pro malý, střední a velký T antigen. Žlutě je vyznačen gen pro VP3 protein, zeleně gen pro protein VP2 a modře gen pro protein VP1. Vytvořeno dle (Fluck & Schaffhausen, 2009) pomocí *Biorender.com*.

2.2.1 Struktura virové částice

45 nm kapsida MPyV s ikosahedrální symetrií je tvořena 3 strukturními proteiny obklopujícími genom. Povrch částice je tvořen z 360 molekul majoritního proteinu VP1 spojených do pentamer, kterých je v kapsidě celkově 72 (Liddington et al., 1991). Minoritní proteiny VP2 nebo VP3 jsou naopak uschovány v centru pentamery z vnitřní strany kapsidy, přičemž každý pentamer obsahuje právě jeden minoritní protein (Griffith et al., 1992) a do kontaktu s vnějším prostředím se dostávají až při částečném rozvolnění kapsidy v endosomálních váčcích a endoplasmatickém retikulu.



Obrázek 2: **Průřez částicí myšího polyomaviru.** Vlevo je kompletní MPyV částice tvořená 72 pentamery proteinu VP1. Uprostřed je poté pentamer a vpravo průřez pentamerem, uvnitř kterého je protein VP2 či VP3, které jsou do vznikající kapsidy zabaleny na základě silné hydrofobní interakce mezi proteiny VP2/3 a VP1. Rudě je vyznačeno vazebné místo k proteinu VP1. Vytvořeno podle (Geiger et al., 2011) pomocí *Biorender.com*.

VP1 protein

Hlavní kapsidový protein o molekulové hmotnosti 45 kDa je exprimován v pozdní fázi virové infekce a je zodpovědný za složení kapsidy, interakci částice s receptorem na povrchu buňky a následný vstup do ní. Jak bylo zmíněno výše, pět molekul VP1 se shlukuje do jedné pentamery a následně 72 pentamer tvoří kapsidu. Jednotlivé pentamery jsou drženy pospolu díky interakci C konce VP1, zároveň je to právě C konec, který váže vápenaté ionty, které spolu s disulfidickými vazbami mezi pentamery, stabilizují kapsidu jako celek (Hare & Chan, 1968; Haynes et al., 1993; Stehle & Harrison, 1996). Prostřední část VP1 je tvořena z velké většiny β -listy, které jsou mezi sebou propojené četnými smyčkami, z nichž smyčky BC, DE a HI jsou vystaveny na povrchu částice a obsahují vazebné místo pro receptor a ko-receptor. Smyčky BC a HI interagují přímo s receptorem – s gangliosidy s kyselinou sialovou (Stehle & Harrison, 1996), a smyčka DE poté s ko-receptorem $\alpha 4\beta 1$ integrinem (Caruso et al., 2003). Prostřednictvím DNA vazebné domény na N koncové části (Haynes et al., 1993), která je zanořena dovnitř pentameru a kde se také nachází jaderný lokalizační signál (NLS) (Chang et al., 1992), dochází

k nespecifické vazbě s DNA (Moreland et al., 1991). Přestože protein VP1 obsahuje NLS, experimenty s viru podobnými částicemi obsahujícími pouze protein VP1 ukázaly, že navzdory dříve publikovaným výsledkům a možnému vstupu do jádra (An et al., 2000), částice odvozené od MPyV nebyly detekovány v jádře, ale na vnější jaderné membráně. Autorka publikace nabízí vysvětlení zahrnující malé množství virionů, které vstoupily a jsou tak pod detekčním limitem, či rychlou degradaci VP1 v jádře (Richterová et al., 2001).

Minoritní proteiny VP2 a VP3

Minoritní proteiny VP2 a VP3 jsou stejně jako protein VP1 exprimovány až v pozdní fázi virové infekce. Translace obou proteinů probíhá ze stejného čtecího rámce, proteiny mají shodnou C-koncovou oblast a vznikají alternativním sestřihem ze společné pre-mRNA. Nicméně delší VP2 protein o molekulové hmotnosti 35 kDa je na N konci posttranslačně modifikován myristilací (Streuli & Griffin, 1987), zatímco u kratšího VP3 proteinu s molekulovou hmotností 23 kDa nejsou žádné modifikace známy. Myristilovaný protein je pravděpodobně důležitý pro uvolnění viru z buňky a následnou reinfekci (Mannová et al., 2002; Sahli et al., 1993). K interakci proteinu VP1 s proteiny VP2 a VP3 dochází prostřednictvím jejich C konců na základě hydrofobních vazeb v cytoplazmě v podstatě ihned po translaci. C konec minoritních proteinů pravděpodobně neprochází štěrbinou uprostřed pentamery, ale dojde k vytvoření jakési smyčky, která zajistí, že C i N konec proteinů míří do středu částice (viz obrázek 2) (Barouch & Harrison, 1994; X. S. Chen et al., 1998). Oba proteiny jsou sice přítomny v kapsidě, ale pro její složení nejsou nezbytné. Protein VP2 obsahuje 3 hydrofobní domény (HD1, HD2, HD3), z nichž pouze doména HD1 lokalizovaná na N konci není součástí kratšího VP3 proteinu. Postupnými mutacemi jednotlivých HD bylo zjištěno, že pouze doména HD2 (jež je přítomna na obou proteinech) je zodpovědná za vazbu minoritních proteinů k membránám. Nicméně mutace v doméně HD1 způsobila prodloužení setrvání viru v endoplasmatickém retikulu, zdá se tedy, že viroporinová aktivita, jež je u minoritních proteinů předpokládána, je u proteinu VP2 umožněna spoluprací domén HD1 a HD2. Doména HD3, situovaná u C konce VP2 a VP3 proteinu, tedy v oblasti která je lokalizovaná nejbližší centrální dutině pentameru, nevykazovala ve fyziologických podmínkách viroporinovou aktivitu, nicméně v roztoku s nízkým pH došlo k interakci proteinu s HD3 doménou s liposomy, tedy nanočásticemi tvořenými lipidy, a navíc i k jejich proděravění. Zdá se tedy, že HD3 doména sice má viroporinovou aktivitu v nízkém pH, ale funkce je potlačena uvnitř kapsidy, neboť v endosomu, kde je kyselé pH a kde by se tedy aktivita HD3 domény mohla projevit, nedochází k tak velkému rozvolnění částice, jako je tomu až v ER, kde ale naopak není kyselé pH (Huérfino et al., 2017). Role minoritních proteinů je hojně diskutována, zdá se, že jsou také nezbytné pro transport viru do jádra a pravděpodobně napomáhají

enkapsidaci DNA (Forstová et al., 1993; Giorda et al., 2013; Huerfano et al., 2010; Moreland et al., 1991). Enkapsidace virového genomu však není závislá na sekvenci DNA a vazba DNA je nespecifická (Španielová et al., 2014). V práci Nakanishiho z roku 2007 je popsána spolupráce proteinu VP1 a VP3 viru SV40 patřícího též do čeledi *Polyomaviridae* při vstupu do jádra buňky. Dle něj protein VP1 interaguje s virovou DNA a proto není možná vazba importinu s NLS, nicméně v komplexu s minoritním proteinem VP3 je celá jednotka přenesena. Pravděpodobně totiž dochází k vazbě importinu na jaderné lokalizační místo na VP3 a poté k přenosu (Nakanishi et al., 2007). Soldatová ve své práci ale uvádí, že vazba k importinu a následný přenos u MPyV je efektivnější, pokud jsou VP1 a VP2 MPyV exprimovány společně, podle ní však může docházet k vazbě importinu jak s proteinem VP1, tak VP2 a VP3 buď v komplexu nebo jednotlivě (Soldatova et al., 2018). Avšak pokud jsou proteiny VP2 a VP3 produkovány samostatně v buňkách sf9, nedojde k jejich přenosu do jádra, VP2 protein byl v takovém případě nalezen na membránách a protein VP3 volně v cytoplazmě (Delos et al., 1993; Forstová et al., 1993).

2.2.2 Vstup viru do buňky a následný transport

Internalizace viru do buňky začíná vazbou VP1 proteinu na **receptor**, kterým jsou pro myší polyomavirus netypicky **gangliosidy** (G) a **koreceptor** $\alpha 4\beta 1$ **integrin** v oblastech se zvýšeným obsahem molekul lipidů (Caruso et al., 2003; Stehle & Harrison, 1996). Gangliosidy jsou glykosylované lipidy patřící mezi glykosfingolipidy tvořené ceramidem ukotveným v membráně a oligosacharidem obsahujícím kyselinu sialovou (A. E. Smith et al., 2003; Tsai et al., 2003). U myšího polyomaviru byl popsán vstup do buňky konkrétně interakcí s gangliosidy GD1a (gangliosid se dvěma molekulami kyseliny sialové) a GT1a a GT1b (se třemi molekulami kyseliny sialové) (Buch et al., 2015; Tsai et al., 2003). V těchto místech dochází k tvorbě výběžků, které jsou stabilizovány především kaveolinem (Rothberg et al., 1992).

Po interakci virové částice s receptorem dochází k tvorbě endocytického váčku kolem částice, který často bývá bohatý na kaveolin (Richterová et al., 2001), přičemž ale byla pro MPyV popsána i endocytická dráha nezahrnující kaveolin (Liebl et al., 2006). **Endocytické váčky jsou poté transportovány do endosomu**, jehož kyselé pH může být spojené s konformační změnou kapsidy (Liebl et al., 2006; M. Qian et al., 2009), **a následně do endoplasmatického retikula (ER)** (Kartenbeck et al., 1989), odkud unikají **do cytosolu a posléze se translokují do jádra**. Zároveň bylo ale zjištěno, že MPyV se může vázat na kyselinu sialovou přítomnou nikoliv na gangliosidech, ale na glykoproteinech. Tato interakce sice následně vede k tvorbě váčku a internalizaci částice, ale ta je svedena do neproduktivní dráhy a končí buď degradací v lysosomu nebo exocytózou (Tsai & Qian, 2010), tedy nedojde k přenosu do ER, které je pro úspěšnou infekci nezbytné (Gilbert et al., 2006; Lilley et al., 2006).

Mechanismus úniku do cytosolu a následná cesta do jádra však zatím nejsou zcela objasněny. U viru SV40 byly popsány strukturní změny virové částice vlivem oxidoreduktázy ERp57 uvnitř ER, které následně vedly k penetraci z ER do cytosolu (Geiger et al., 2011). Předpokládá se, že do destabilizace virové kapsidy je v případě MPyV v ER také zapojena oxidoreduktáza ERp57 a ERp29 a disulfid isomeráza (PDI) (Magnuson et al., 2005; Walczak & Tsai, 2011), a poté v cytosolu některé chaperony, například Hsc70 (shrnutí Mayberry et al., 2021). Konformační změny jsou spojené s redukcí disulfidických vazeb, následnou změnou struktury kapsidy a s vystavením minoritních proteinů vnějšímu prostředí, jejichž role je hojně diskutována. Minoritní proteiny se zdají být důležitými hráči při transportu virového genomu do jádra, mají viroporinovou aktivitu a jejich kooperace s VP1 je nutná pro uvolnění viru z endoplasmatického retikula (ER) (Huerfano et al., 2010; Huérfano et al., 2017; Mannová et al., 2002) v časných fázích infekce a dokonce i při transportu VP1 proteinu po jeho expresi v infikovaných buňkách (Horníková et al., 2017). Částečně rozvolněná či až rozpadlá částice je poté z cytosolu za pomoci importinu přenesena do jádra buňky (Soldatova et al., 2018). Kapsida viru tedy musí být stabilní, aby uchránila virový genom, ale současně musí nukleovou kyselinu ve správné chvíli uvolnit.

2.3 Viru podobné částice a jejich možné využití

Strukturní proteiny virů se mohou skládat do takzvaných viru podobných částic (VLP, z anglického *virus like particle*), které neobsahují virovou DNA (Salunke et al., 1989; Slilaty et al., 1982), nemohou se tedy replikovat a jsou neinfekční. Ke vzniku takovýchto částic dochází jak přirozeně při virové infekci, kdy nedojde k zabalení virové DNA dovnitř (Finch & Crawford, 1975), tak také při produkci proteinů v expresních systémech, jak bylo například popsáno v případě VP1 proteinu a VLP odvozených od PyV (Salunke et al., 1989) nebo u částic odvozených od parvoviru (Sánchez-Rodríguez et al., 2012). VLP mohou být, stejně jako viry, od kterých jsou odvozeny, jak obalené lipidovou vrstvou, tak i neobalené (Somiya & Kuroda, 2020). Morfologicky a chemicky stejná schránka si ale zachovává schopnost aktivovat imunitní systém hostitele a receptorovou specifitu, a tím nabízí široké spektrum možností pro využití jak pro přípravu vakcín (Hieu et al., 2002; Kapusta et al., 1999) nebo jako vektory pro přenos terapeutických látek, genů, RNA a proteinů do specifických buněk a tkání (Ghosh & Banerjee, 2021; Kaczmarczyk et al., 2011). Potenciál pro využití těchto částic jen potvrzuje, že již bylo popsáno přibližně 110 částic odvozených od virů patřících do 35 různých virových čeledí (shrnutí Nooraei et al., 2021). V současné době jsou na trhu vakcíny založené na VLP například proti viru hepatitidy B (Merck Recombivax HB® a GlaxoSmithKline's Engerix®) a proti lidskému papilomaviru (Merck Gardasil® a GlaxoSmithKline's Cervarix®) a celá paleta dalších kandidátů na bázi VLP odvozených od řady dalších virů v klinických či preklinických studiích (WHO Position Paper, 2017; shrnutí Nooraei et al., 2021).

Mezi další možné využití patří cílené doručování léčiv, které by samy o sobě byly pro průchod zdravou tkání rizikem a navíc pokud se jedná o látky hydrofobní, nebylo by je možné dodávat samostatně. Přičemž účinný přenos hydrofobních chemoterapeutik, jako je doxorubicin, do nádorových buněk, je jedním z nejpálčivějších problémů v léčbě rakoviny. Zabalení takových léčiv například do VLP může zlepšit jak kinetiku dodávaného léčiva, tak zabránit poškození okolních buněk. Proto jsou v posledních letech vyvíjeny a testovány VLP odvozené od vícero virů, například od žloutenky typu B, viru tabákové mozaiky nebo „*Flock house*“ viru pro přepravu zmíněného doxorubicinu (Aljabali et al., 2013; Biabanikhankahdani et al., 2016; Ghosh & Banerjee, 2021).

2.4 VLP a pseudoviriony odvozené od myšího polyomaviru

Viru podobné částice odvozené od myšího polyomaviru jsou jedním z ideálních vektorů, neboť nativní virová kapsida je tvořena pouze VP1 proteinem, který je schopen se sám uspořádat do viru podobné partikule bez nutnosti dalších pomocných proteinů. Další výhodou je možnost složení částice obsahující nejen VP1 protein, ale i minoritní proteiny a možnost zabalení proteinu či jiných látek malé molekulové hmotnosti, případně DNA o maximální velikosti virového genomu, neboť byla popsána schopnost proteinu VP1 nespecificky vázat DNA, ne nutně vlastní virovou (Forstová et al., 1995; Gillock et al., 1997; Moreland et al., 1991; Španielová et al., 2014). Virové částice obsahující zabalenou nevirovou (reportérovou) DNA jsou označovány jako pseudoviriony (PsV), a v rámci této diplomové práce také jako virpotéry.

VLP lze produkovat expresí rekombinantního proteinu VP1 v heterologních expresních systémech *in vitro* či *in vivo*. Pro produkci proteinů *in vitro* je využíván bakteriální expresní systém v buňkách *Escherichia coli*, přičemž je možné produkovat a následně izolovat velké množství proteinu (Leavitt et al., 1985). Nevýhodou však je absence posttranslačních modifikací proteinů, které se podobají těm eukaryotickým a zachyt proteinů v inkluzním tělísku, odkud je sice možné je vyizolovat, ale izolace je spojená s poměrně značnou ztrátou materiálu (Singh et al., 2015). VP1 protein je bakteriemi produkován ve formě pentamerů, a poté *in vitro* složen do VLP (Salunke et al., 1986). V průběhu let se podařilo produkovat VP1 protein a VLP v řadě systémů: konkrétně v systému kvasinkovém, savčím či bakulovirovém (Chuan et al., 2008; Gerstweiler et al., 2021; Liew et al., 2010). Jednotlivé systémy se od sebe liší množstvím produkovaného proteinu, jeho čistotou, finančními a časovými náklady, ale i posttranslačními modifikacemi (shrnuje Teunissen et al., 2013). V rámci diplomového projektu bylo využíváno produkce VLP pomocí bakulovirového systému a pseudovirionů a/ nebo virpotérů v systému

savčím. Tyto expresní systémy umožňují produkovat kromě proteinu VP1 i proteiny minoritní s posttranslačními modifikacemi (An et al., 1999; Forstová et al., 1993; Li et al., 1995).

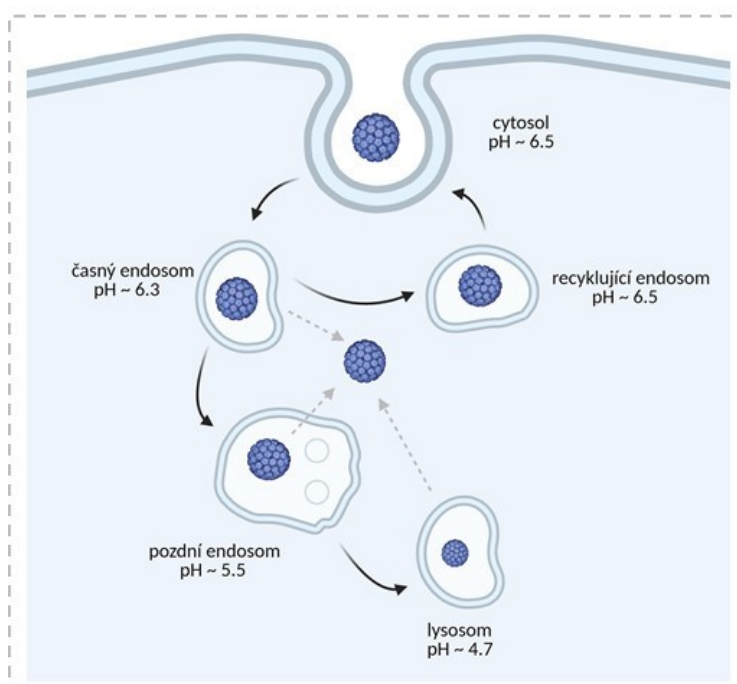
Ve fyziologických podmínkách roztoku není třeba posttranslačních modifikací pro složení VLP, nicméně je diskutována vyšší efektivita skládání a následného využití VLP (Salunke et al., 1989). Stabilita složených VLP je ovlivněna koncentrací vápenatých iontů, vázaných přes C konec proteinu VP1, které jsou zároveň potřebné pro složení částic (Adamec et al., 2005). Zkrácení C konce ovlivní VP1 natolik, že není schopen se složit do VLP (Garcea et al., 1987). Zároveň bylo popsáno, že změnou iontové síly, pH či koncentrace vápenatých kationtů v roztoku, může dojít ke složení VLP vícero tvarů a velikostí, například uspořádáním do dlouhé tubulární kapsidy či do takzvaných „tiny“ částic, jejichž velikost je menší než standardních částic (Salunke et al., 1989).

Výhodou MPyV VLP je velmi snadná modifikace ať už proteinu VP1 či minoritních proteinů, které navíc mohou sloužit i jako jakési kotvy pro fúzi externího proteinu (Bouřa et al., 2005). Mezi další výhody patří, že dle Žáčkové-Suchanové MPyV VLP nejsou ovlivněny proteinovou korunou (Zackova Suchanova et al., 2020). Povrch částice lze modifikovat přidáním imunogenního epitopu pro stimulaci imunitní odpovědi (Seth et al., 2016; Tekewe et al., 2017). Takové využití již bylo publikováno u VLP odvozených od myšího polyomaviru, jehož strukturní protein VP1 byl modifikovaný T nebo B buněčnými epitopy *Plasmodium yoelii*. Dle Pattinsona tyto chimerické VLP dokázaly vyvolat rozsáhlou odpověď B a CD8+ T buněk, nicméně indukce CD4+ T buněk byla zanedbatelná (Pattinson et al., 2019). MPyV VLP byly již také využity při vývoji rekombinantní vakcíny proti prasečímu cirkoviru 2 (Fraiberk et al., 2017).

Další možné využití částic odvozených od PyV je v dopravě cizorodé DNA pomocí pseudovirionů. Pseudoviriony jsou viru podobné částice nesoucí zabalenou nevirovou reportérovou (případně terapeutickou) DNA (Buck et al., 2004). K takovému zabalení může dojít dvěma způsoby. Prvním je rozvolnění VLP změnou fyziologických podmínek, inkubací s DNA, která se nespecificky naváže (Gillock et al., 1997) a následným znovusložením VLP zpět do intaktní částice. Druhým způsobem je zabalení DNA, ke kterému dojde v jádře buňky již při sestavování částic z produkovaných proteinů v expresním systému (Španielová et al., 2014). Přičemž již bylo potvrzeno, že částice odvozené od MPyV se zabalenou cizorodou DNA lze využít pro dopravu do jádra savčích buněk (Forstová et al., 1995). Do takovýchto částic je, kromě DNA, možné vložit cizorodý protein fúzí s minoritními proteiny, přičemž bylo potvrzeno, že pentamery se poté skládají do částice a dokáží vstoupit do buňky (Bouřa et al., 2005; Škvára 2020).

2.5 Problém degradace a uvěznění materiálu v endosomu

Jedním ze současných problémů, které omezují možnosti využít virové či nevirové vektory pro dopravu léčiv do buněk, je jejich zachycení v endolysosomálním systému a jejich následná enzymatická degradace v lysosomu (Shete et al., 2014), kde lze detekovat i subpopulaci MPyV VLP při pseudoinfekci buněk (Bouřa et al., 2005). Některé patogeny, jako například obalené viry, se vyhýbají tomuto zachycení díky tomu, že indukují fúze s buněčnými membránami, nicméně neobalené viry – jako námi studovaný myší polyomavirus nebo nevirové vektory, s výjimkou liposomálních nanočástic, tuto možnost vstupu do buňky nemají. Endocytóza, kterou jsou z velké většiny do buňky internalizovány, vede částice právě do endosomu. Respektive vstup částice do buňky vede nejdříve do časného endosomu (viz obrázek č. 3), kde dochází k mírnému okyselení prostředí na pH ~ 6,5, maturací časného endosomu do pozdního endosomu dochází k dalšímu snížení pH na ~ 5,5 a nakonec fúze endosomu s lysozomem je spojena s okyselením prostředí na pH ~ 4,7 (shrnuje v Pei & Buyanova, 2019). Prostudování možností modifikace částic, která bude vést k destabilizaci membrány spojené s únikem z endosomu, je proto v dnešní době jednou z klíčových, protože přenášený náklad, ať už DNA či jiné terapeutické látky, je nutné doručit do cytosolu či až do jádra. Jednou z možností nabízející řešení tohoto problému je například konjugace nanočástic s peptidy penetrujícími membrány.



Obrázek 3: **Schéma endocytické dráhy.** Po vstupu částice do buňky je částice uzavřena do endocytického vakuolu, který sčítá s časným endosomem, jež maturuje do pozdního endosomu, a poté fúzí s lysozomem. Postupné kroky jsou doprovázeny okyselením prostředí. Vytvořeno dne (Pei & Buyanova, 2019) pomocí *Biorender.com*

2.6 Peptidy penetrující membrány

Peptidy penetrující membrány jsou peptidy složené z méně než 30 aminokyselinových zbytků schopných účinně vstupovat do buněk (Alhakamy et al., 2013). Od roku 1988, kdy byl objeven protein TAT z viru HIV a od zjištění, že efektivně vstupuje do savčích buněk, a následně dokáže proniknout až do jádra (Frankel & Pabo, 1988; Green et al., 1989), byla studována celá řada peptidů, které mají potenciál vstoupit do buněk a případně zprostředkovat přenos do buňky dalšímu nákladu. Studium potenciálních CPP bylo ještě více posíleno po roce 1997, kdy bylo zjištěno, že pouze 12 aminokyselinových zbytků (GRKKRRQRRRPQ) z původní sekvence proteinu TAT je nezbytných pro vstup do buněk (Vivès et al., 1997). Čímž se z nich stal zajímavý nástroj jak pomocí relativně malé modifikace přenášené látky umožnit efektivní přenos přes membrány.

Způsobů, jak CPP klasifikovat do skupin je vícero a lze je rozlišit na základě různých charakteristik peptidů. Nutno zmínit, že rozdělení není absolutní a jednotlivé CPP mohou patřit i do více funkčních tříd. Jedna z možností klasifikace zohledňuje mechanismus vstupu, ten může být jak energeticky závislý, v případě endocytózy, tak také na dodání energie nezávislý, v případě přímé translokace. Častější je však rozlišení na základě původu, který rozděluje CPP do tří hlavních skupin: Prvním z nich jsou peptidy odvozené od původně běžně se vyskytujících proteinů jako je TAT, penetratin nebo HRSV (Langedijk et al., 2005), druhou skupinou jsou peptidy chimerické složené ze dvou membránově aktivních proteinů (např. transportan) (Fadzen et al., 2019; shrnul Langel, 2015). Poslední skupina zahrnuje syntetické peptidy, které byly speciálně navrženy a jsou inspirované těmi, jenž se vyskytují v proteinech přirozeně (např. polylysin, poylarginin, LAH4, KH27K aj.). Další možností, kterou lze CPP rozlišit a která bude využita v této práci, je rozdělení CPP na základě jejich fyzikálně – chemických vlastností. **CPP** se v tomto případě dělí na **hydrofobní**, ty jsou složeny z hydrofobních aminokyselinových (AMK) zbytků (např. FGF12), dále CPP **amfipatické** složené z polární (hydrofilní) a nepolární (lipofilní) domény (např. MPG) a konečně CPP **kationické** složené z AMK zbytků histidinu, argininu a/či lysinu (např. TAT) (shrnutí v Langel, 2015; Váňová et al., 2019).

CPP jsou tedy pro jejich schopnost účinně překonávat buněčné membrány pečlivě studovány a konjugovány jak s vektory (Nigatu et al., 2015; Váňová et al., 2020), tak přímo s DNA, RNA či siRNA (Kim et al., 2006). **Konjugace CPP s přenášeným nákladem** může probíhat na více úrovních. Jednou z možností je **kovalentní modifikace** zahrnující jak připojení geneticky – rekombinantní, tak chemické. **Druhá možnost** zahrnuje **nekovalentní připojení** a pouhou ko-inkubaci CPP s nákladem (shrnutí (Sánchez-Navarro, 2021; Váňová et al., 2019)). Nicméně kovalentní modifikace může mít i negativní vliv na funkci a stabilitu fúzovaného vektoru, jak bylo popsáno v případě genetické modifikace VP1 proteinu odvozeného od MPyV peptidy bohatými na histidiny (PHP, z angl. *polyhistidine peptides*),

kde modifikovaný VP1 byl překážkou pro složení VLP (Polidarová, 2016) či v případě fúze Cas9 proteinu s CPP složeným z 9 argininů, 4 glycinů a leucinů. V tomto případě konjugace s pozitivně nabitým peptidem vedla k precipitaci fúzovaného proteinu (Ramakrishna et al., 2014). Při kovalentní chemické modifikaci lze využít připojení CPP přes chemickou kotvu (Gan et al., 2018) (prostřednictvím AMK zbytků například cysteinu a lysinu k povrchu částice), která představuje poměrně snadnou variantu modifikace částice.

Přesná identifikace způsobu internalizace CPP buňkou je poměrně obtížná (Váňová et al., 2020), a navíc ji ztěžuje fakt, že vstup do buněk je ve vhodných fyziologických podmínkách poměrně rychlý. Jednoznačně ale **vstup závisí na vícero faktorech** jako je lokální koncentrace, sekvence a struktura peptidu, typ buněčné linie (Jiao et al., 2009; Lättig-Tünnemann et al., 2011; Mueller et al., 2008; Patel et al., 2019), ale i vlastnosti přenášeného nákladu (Ma et al., 2011). Obecně k internalizaci dochází buď procesem nezávislým na dodání energie, tedy přímou translokací, či procesem vyžadujícím dodání energie a tím je endocytóza. Endocytózu lze rozdělit do pěti specifických typů a to na fagocytózu, přítomnou jen u konkrétních typů buněk, například fagocytů, makropinocytózu a endocytózu zprostředkovanou klathrinem nebo kaveolinem, posledním typem je endocytóza na klathrinu a kaveolinu nezávislá. Poslední tři jsou označovány jako endocytóza zprostředkovaná receptorem a dochází k ní tedy po interakci částice s receptorem. Ohledně způsobu vstupu CPP do buňky není odborná literatura konzistentní. Jedním z popsaných mechanismů vstupu je makropinocytóza, velmi zjednodušeně řečeno buněčné pití. U peptidu bohatého na argininy byl popsán případ, kdy inhibice makropinocytózy nízkou teplotou vedla k internalizaci peptidu přímou translokací (Futaki et al., 2007), která je popsána především u vyšších koncentrací CPP nahrazením makropinocytózy (Fretz et al., 2007), což je v rozporu s výsledky Patel, který ani po ošetření HeLa buněk 100 uM značeným cyklickým R8 CPP (polyarginin složený z 8 AMK zbytků argininu) nedetekoval přímou translokaci, nýbrž vstup pomocí endocytózy (Patel et al., 2019). Stejně tak Jiao pozoroval translokaci při analýze nižší koncentrace CPP přidávaných k buňkám, kterou s rostoucí koncentrací CPP nahradila endocytóza (Jiao et al., 2009). Zároveň byl popsán vliv přenášeného nákladu na způsob internalizace. V případě konjugace CPP s nákladem s malou molekulovou hmotností byla popsána jako způsob vstupu právě přímá translokace, naopak fúzí s nákladem s vyšší molekulovou hmotností došlo k internalizaci celého komplexu pomocí makropinocytózy (Ma et al., 2011). Nicméně jak již bylo zmíněno, internalizaci velmi ovlivňuje i typ buněčné linie a lokální koncentrace.

2.6.1 Peptidy bohaté na arginin

Jedněmi z detailně studovaných CPP posledních let jsou peptidy bohaté na arginin, takzvané polyargininy odvozené od TAT proteinu viru HIV. Polyargininy jsou kationické peptidy s potenciálem efektivní internalizace do buněk (Futaki et al., 2001; Rothbard et al., 2000), přičemž nejúčinnější varianta co do počtu argininů v peptidu je 8 (R8). Oligoargininy s více i méně argininovými zbytky efektivitu vstupu do buňky pouze snižují (Futaki et al., 2003). Polyargininy mohou vstupovat do buňky více způsoby, jedním z nich je přímá internalizace spojená se vznikem pórů (Herce et al., 2009; Ma et al., 2011), dalším způsobem je indukce makropinocytózy (El-Sayed et al., 2008; Khalil et al., 2006), nebo vazba na proteoglykany a/nebo fosfolipidy na povrchu membrány a následná endocytóza (Gonçalves et al., 2005). Zároveň je u těchto peptidů diskutována i možnost destabilizace membrány spojená s vyšší permeabilizací a následným vstupem částice s CPP přímo do cytosolu bez vzniku pórů v membráně (Sakamoto et al., 2021). Ve spojitosti s liposomy byl popsán účinnější únik z endosomu fúzí s endosomální membránou u liposomů modifikovaných R8 proti modifikaci K8 (polylysinem) (El-Sayed et al., 2008). Účinek R8 byl poté prokázán v řadě studií pro zlepšení dopravy terapeutických látek do buněk (Biswas et al., 2013; Deshpande et al., 2018). Biswas a kolegové v roce 2013 modifikovali DOXIL[®] (doxorubin zabalený do PEGovaného liposomu) pomocí molekul R8 peptidu. Modifikace umožnila proniknout doxorubicinu z endosomu a dostat se až do jádra, což bylo potvrzeno následnou cytotoxicitou (Biswas et al., 2013). Deshpande a kolegové poté stejně jako Biswas využili R8-DOXILu[®] navíc s navázaným transferinem s úmyslem zacílit částice na nádorové buňky, které exprimují ve zvýšené míře transferinové receptory. Dle Deshpandeho došlo k efektivnímu zacílení na konkrétní buňky a ke stejnému efektu, jaký pozoroval Biswas, tedy k účinnému úniku z endosomu díky modifikaci R8 a následnému zacílení do jádra (Deshpande et al., 2018).

2.6.2 Peptidy bohaté na histidin

Dalšími hojně studovanými CPP jsou peptidy bohaté na histidin představující slibnou možnost, jak předejít degradaci doručovaného materiálu v endolysosomálním systému (Ferrer-Miralles et al., 2011). Aktivita histidinu je totiž silně závislá na pH. Histidiny mají imidazolový kruh s pKa okolo 6,5, a jsou tedy za fyziologických podmínek neutrální, nicméně ke změně elektrického náboje dochází v kyselém pH (přítomném právě v endosomálních a lysosomálních váčcích nebo v nádorovém mikroprostředí), v němž se imidazolový kruh začíná protonovat (Bechinger, 1996; Behr, 1997). Jedním z prvních peptidů, u nějž byla prokázána permeabilizační aktivita a pro svou aktivitu vyžaduje kyselé pH, byl již v roce 1998 peptid H5WYG (Midoux et al., 1998). V kyselém pH dochází ke strukturním změnám a PHP zaujímají

neuspořádanou strukturu, naopak v pH neutrálním a zásaditém pravděpodobně zaujímají strukturu β barelu (Midoux et al., 1998). Aktivita peptidu byla také potvrzena modifikací VLP odvozených od bakteriofága MS2, které obsahovaly enkapsidovaný toxin ricin A a byly zacíleny na hepatocelulární rakovinné buňky. Dle Ashleyho a kolegů došlo vlivem peptidu H5WYG k účinnému úniku z endosomu umožňující následnou aktivitu VLP (Ashley et al., 2011). Lo a Wang konjugovali TAT protein s H10 peptidem a pozorovali až 7 tisíckrát vyšší účinnost transfekce buněk v porovnání s původním peptidem TAT (Lo & Wang, 2008).

V roce 2015 byl Iwasakim popsán nový typ CPP složený pouze z AMK zbytků histidinu. Účinnost vstupu byla potvrzena u savčích buněk, u nichž byly popsány PHP s delším histidinovým řetězcem (H16 a více) jako efektivnější (Iwasaki et al., 2015), v posledních letech byl studován i vliv délky řetězce na vstup do buněk rostlinných, u kterých bylo naopak prokázáno, že PHP s kratším řetězcem (H6-H10) jsou úspěšnějšími (Kimura et al., 2017; Tanaka et al., 2021).

Dle matematického modelu publikovaného ve studii López-Laguna není vstup do buňky ani únik z endosomu přímo závislý na množství molekul histidinu v peptidu, zároveň ale vědecká skupina pozorovala negativní korelaci mezi počtem internalizovaných peptidů bohatých na histidin a účinností úniku z endosomu (López-Laguna et al., 2019).

PHP jsou velmi často syntetizovány v kombinaci s lysinovými AMK zbytky, které zvyšují rozpustnost ve vodných roztocích a vazbu s DNA (Kichler et al., 2003). Tyto částice jsou poté účinnými nosiči DNA a siRNA jak *in vitro*, tak *in vivo* (Chou et al., 2014). Výhodou pro modifikaci povrchu přenášeného nákladu pomocí PHP je fakt, že na rozdíl od nabitých CPP, je PHP komplex v neutrálním pH nenabitý a nedochází tak k nespecifické vazbě se sérovými proteiny a komplex není ovlivněn či inaktivován přítomností séra (Iwasaki et al., 2015; Midoux et al., 1998). Zároveň byla v souvislosti s PHP studována stabilita viru podobných částic odvozených od hepatitidy B a bylo potvrzeno, že modifikace C konce strukturního proteinu pseudokapsidy pomocí PHP vedla ke zvýšení mechanické a/nebo chemické stability (Schumacher et al., 2018).

PHP jsou také často používány jako purifikační značky při produkci rekombinantních proteinů, neboť umožňují snadnou izolaci His-značených proteinů z média či z roztoku s dalšími neznačenými proteiny. Pokud histidinová kotva není po izolaci odstraněna, může proteinu propůjčit některé unikátní vlastnosti, jako například odolnost vůči proteolytickému štěpení (Ferrer-Mirallés et al., 2011).

2.6.3 LAH₄

Dalším intenzivně studovaným CPP používaným v experimentální části diplomového projektu je peptid LAH₄, který podobně jako CPP v předchozí kapitole, obsahuje histidinové zbytky, liší se však svými vlastnostmi. LAH₄ je syntetický kationický amfipatický peptid odvozený z antimikrobiálních peptidů a složený z AMK zbytků alaninu (A), histidinu (H), leucinu (L) a lysinu (K) (KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA) (Bechinger, 1996). V neutrálním pH, při kterém bylo zjištěno, že je LAH₄ schopen účinně vázat DNA (Kichler et al., 2003), udělují peptidu náboj aminokyselinové zbytky lysinu a N konec peptidu, a v kyselém pH poté dojde vlivem protonace histidinů k dalšímu zvýšení náboje (Kichler et al., 2007) a pravděpodobně i k uvolnění DNA z peptidu a jeho přesunu k povrchu membrány (Bechinger, 1996). Molekuly lysinu jsou pravděpodobně zodpovědné za rozpustnost ve vodném roztoku a vazbu na DNA (Kichler et al., 2003). LAH₄ typicky zaujímá strukturu α -helixu, přičemž AMK zbytky polárního histidinu jsou v molekule umístěny vždy na jedné straně a zbytky nepolárních AMK na straně druhé (Kichler 2003, Vogt a Bechiner 1999).

Efektivita přenosu pomocí LAH₄ již byla popsána ve spojitosti v několika náklady. V odborné literatuře je pomocí LAH₄ popsán úspěšný přenos siRNA (Lam et al., 2012), DNA (Kichler et al., 2003), beta-galaktosidázy (Moulay et al., 2017) nebo zvýšení transdukce virových vektorů (Liu et al., 2014; Y. Meng et al., 2021; Váňová et al., 2020). Dle Meng peptid LAH₄ zvýšil transdukci vektoru odvozeného od adeno-asociovaného viru v CNS in vivo i in vitro. Ke zvýšení pravděpodobně došlo díky překonání hematoencefalické bariéry vlivem právě peptidu LAH₄ (Y. Meng et al., 2021). Dvě nezávislé studie (Váňová et al., 2020) a (Liu et al., 2014) pozorovali vznik agregátů pseudovirionů odvozených od MPyV nebo adeno-asociovaného viru po inkubaci s peptidem LAH₄. V obou případech byla potvrzena zvýšená transdukce, která byla v případě adeno-asociovaného viru spojena s efektivnější buněčnou internalizací (Liu et al., 2014), avšak nikoliv v případě MPyV částic. Dle Váňové sice došlo ke tvorbě agregátů, ale nikoliv ke zvýšení počtu internalizovaných částic ihned po infekci (Váňová et al., 2020). Mechanismus stojící za zvýšením transdukce tedy pravděpodobně spočívá v následujících krocích uvnitř buňky.

2.7 Endosomální únik

Nanočástice funkcionalizované CPP a/nebo citlivé na změnu pH vlivem modifikace PHP prokazují schopnost účinného úniku z endosomálního váčku (El-Sayed et al., 2008; Ferrer-Miralles et al., 2011; Hwang et al., 2014; Z. Meng et al., 2017). V současnosti je navrženo více způsobů, kterými k úniku z váčku dochází. Prvním z nich je hypotéza protonové houby (Behr, 1997), druhým je teorie navrhuující interakci

NP přímo s endosomální membránou doprovázená fúzí, třetím je destabilizace membrány vlivem CPP a posledním navrženým způsobem je bobtnání částice spojené s prasknutím váčku.

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.6.2, po uzavření PHP v endosomu s kyselým pH dochází podle **teorie protonové houby** k protonaci atomu dusíku na imidazolovém kruhu. Atom dusíku se dvěma elektrony může přijímat atomy vodíku a následně pufovat kyselé prostředí uvnitř váčku. Aktivním přesunem vodíkových iontů do endosomu zajišťujících udržení jeho kyselého pH dochází také ke vstupu chloridových iontů, což poté vede k pasivnímu transportu molekul vody do endosomu. Tímto transportem dochází k naplnění váčku vodou, tedy k osmotickému otoku, který vede k prasknutí endosomální membrány a úniku NP do cytosolu (Behr, 1997, shrnuto v He et al., 2020).

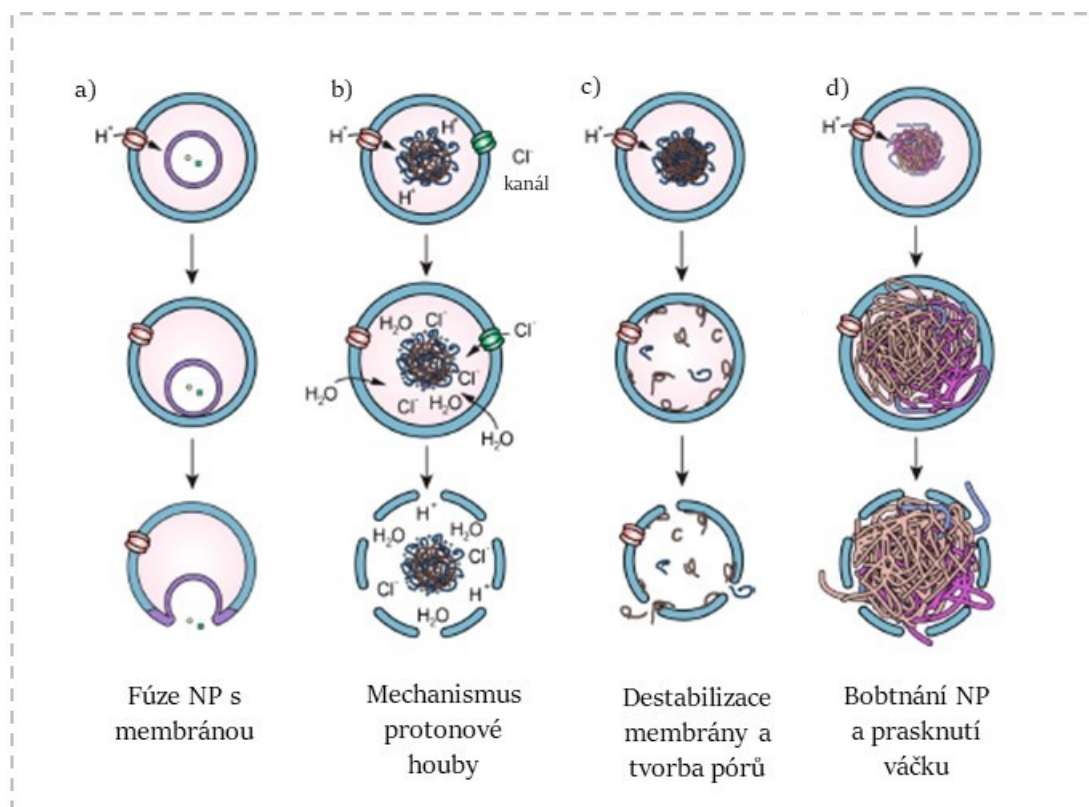
Druhou možností je únik z endosomu pomocí **fúze membrán**, ale k té může dojít pouze v případě fúze nanočástice obalené lipidickým obalem, což mohou být některé viru podobné částice nebo liposomy (El-Sayed et al., 2008). Pravděpodobně se jedná o extrémně rychlý proces. Dle Mouta a kolegů dochází k fúzi již 30 sekund po kontaktu s membránou (Mout et al., 2017).

Třetím způsobem, jak může k úniku z endosomu pravděpodobně dojít, je **destabilizací membrány** vlivem působení CPP. Vlivem interakcí náboje CPP a náboje na membráně může dojít k lokální destabilizaci spojené se zvýšenou propustností membrány (shrnuto v Pei & Buyanova, 2019). Například způsob úniku peptidu LAH4 je hojně diskutován, protože přestože se řadí mezi peptidy bohaté na histidin, předpokládá se, že díky svým amfipatickým vlastnostem, interaguje s membránou již při neutrálním pH a fyzicky ji narušuje při následné protonaci (Kichler et al., 2007). V kyselém pH pravděpodobně dochází k přechodu z alfa-helixového uspořádání do neuspořádané konformace a k dalšímu zanoření do membrány spojené s narušením membrány a následným únikem přenášeného materiálu z endosomu (Iacobucci et al., 2012). Interakce takovýchto CPP může pravděpodobně vést i ke vzniku pórů – takzvaných barelových či toroidních. U prvního zmíněného je předpokládáno, že dochází k zarovnání CPP rovnoběžně s fosfolipidy, kdy hydrofobní část CPP je natočena směrem k fosfolipidům a hydrofilní do středu póru. U toroidního póru jsou naopak CPP kolmo k povrchu membrány, čímž je usnadněno zvlnění membrány a vznik toroidního póru. Hlavním nedostatkem těchto hypotéz je však především prostorově větší velikost přenášeného nákladu proti póru. Pokud by totiž mělo dojít k formování póru pro průměrně velký globulární protein, bylo by potřeba pór vytvořit z 15-20 alfa helixů nebo ještě většího množství beta listů, a i tak by stále hrozilo, že zablokují pór (shrnuto v Pei & Buyanova, 2019).

Poslední diskutovaný způsob úniku z endosomu je specifický pro částice citlivé na změnu pH, u kterých vlivem kyselého pH dochází k postupnému bobtnání částice a poté pravděpodobně k prasknutí

váčku. Bobtnání částice a s tím spojená změna její velikosti je pravděpodobně dána elektrostatickým odpuzováním a následnou solvatací nabitého polymeru uvnitř částice (shrnutí Smith et al., 2019).

Nutno však zmínit, že k úniku z jednoho endosomu může pravděpodobně dojít vícero způsoby současně či postupně (Qian et al., 2016).



Obrázek 4: **Schéma možností úniku z endosomu** a) první možností je prostá fúze membrány s lipidickou částicí či lipidickým obalem viru, b) mechanismus protonové houby navrhovaný u některých NP citlivých na změnu pH, c) indukovaná destabilizace membrány interakcí NP s membránou spojená s tvorbou pórů, d) bobtnání nanočástice vlivem změny pH a následné prasknutí váčku (převzato a upraveno Smith et al., 2019)

Takovéto poškození endocytických váčků však může mít negativní dopad na buňku a správné fungování endolysosomálního systému je nezbytné pro udržování vnitřní homeostázy. Studie Heleny Kondow-McConaghy provedená v roce 2020 nicméně dokazuje, že protože jsou v některých případech aktivovány opravné mechanismy, analog CPP TAT odvozený od viru HIV, který účinně uniká z endosomu, nevyvolává po permeabilizaci membrány poškození buňky jako celku (Kondow-McConaghy et al., 2020).

Zvýšení efektivity transdukce pomocí CPP bylo v minulosti popsáno u virových vektorů odvozených od adenovirů, adeno-asociovaných virů, lentivirů a pseudovirionů odvozených od MPyV, SV40 a myšího

papilomaviru (Meng et al., 2021; Nigatu et al., 2013, 2015; Váňová et al., 2020). Dle studie z roku 2008, která porovnávala účinnost vstupu u 22 různých CPP napříč 4 buněčnými liniemi a která zahrnovala i krátkou sekvenci proteinu VP1 odvozeného od MPyV, VP1 protein vstupoval do buněk s velmi malou efektivitou a v porovnání s peptidy jako je R9, byl i následně velmi málo pozorován v cytosolu (Mueller et al., 2008). V minulých letech se v Laboratoři virologie Mgr. Markéta Polidarová snažila produkovat VLP složené z proteinu VP1, který byl kovalentně – geneticky modifikován s CPP PHP pro zvýšení transdukčního potenciálu, zlepšení efektivity vstupu a úniku z endosomu, nicméně se bohužel ukázalo, že modifikace proteinu VP1 je překážkou pro složení VLP (Polidarová, 2016). Proto se snaha o vylepšení výše uvedených charakteristik částice přesunula na modifikaci minoritního proteinu VP3, který není klíčovým proteinem při skládání VLP, a tak by jeho fúze s CPP neměla ovlivnit její stabilitu. Minoritní protein VP3 totiž může sloužit i jako kotva pro fúzi s CPP zajišťující stabilní udržení proteinu ve VLP (Škvára, 2020). Mgr. Petr Škvára ve své diplomové práci charakterizoval pseudoviriony modifikované některými z CPP a nepozoroval ani v jednom z případů překážku pro efektivní složení částice.

3 CÍLE PRÁCE

- 1) Zjistit, zda virové částice modifikované polyhistidinovými peptidy doručují DNA do buněk efektivněji než nemodifikované částice
- 2) Zjistit, zda se virové částice modifikované polyhistidinovými peptidy dostávají v průběhu intracelulárního transportu do cytoplazmy
- 3) Porovnat virové částice modifikované polyhistidinovými peptidy při dopravě DNA (ad 1) a intracelulárním transportu (ad 2) s virovými částicemi modifikovanými jinými CPP (R8, LAH4)

Dílčí cíle

- příprava kontrolních virových částic a částic modifikovaných polyhistidinovým peptidem
- charakterizace produkovaných modifikovaných a nemodifikovaných částic
- analýza vlivu modifikace na uvolnění do cytoplazmy

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Antibiotika

- Ampicilin – výsledná koncentrace v mediu 100 µg/ml (Biomedica)
 - Hygromycin B Gold – výsledná koncentrace v mediu 400 µg /ml (InvivoGen)
 - Kanamycin – výsledná koncentrace v mediu 50 µg/ml (Biomedica)
 - Zeocin™ – výsledná koncentrace v mediu 50 µg/ml (InvivoGen)
-
- Směs antibiotik pro tkáňové kultury – zásobní 100x koncentrovaný roztok obsahuje 25 mg amphotericinu B, 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu v 1 ml (Gibco, Sigma)

4.1.2 Buněčné kultury

Bakteriální buňky

- **TOP10** – elektrokompetentní buňky pocházející z kmene *Escherichia coli*

Eukaryotické buňky

Hmyzí buněčná linie

- **Sf9** – buňky pocházející z tkáně ovárií motýlů *Spodoptera frugiperda* využívané pro expresi proteinů z bakulovirového expresního systému

Lidská buněčná linie

- **293TT** – buňky pocházející z embryonálních buněk ledvin modifikovaných integrací DNA viru SV40 nesoucí gen pro velký T antigen viru SV40 a gen kódující rezistenci na antibiotikum hygromycin.

Myší buněčná linie

- **NIH3T6** – myší fibroblasty vhodné pro MPyV infekci (prof. Griffin, Royal Postgraduate School, Londýn)

4.1.3 Často používané roztoky a chemikálie

- 1x koncentrované PBS (pH = 7,4)
 - 2,7 mM KCl (Lachner)
 - 1,8 mM KH_2PO_4 (Lachner)
 - 137 mM NaCl (Lachner)
 - 10 mM Na_2HPO_4 (Penta)
- DPBS (Lonza)
 - Dulbecco fyziologický roztok pufrovaný fosfátem
- 10x koncentrovaný pufr B
 - 0,01 mM CaCl_2 (Sigma-Aldrich)
 - 150 mM NaCl (Lachner)
 - 10 mM Tris- HCl, pH = 7,4 (Serva)
- 1 M Tris – HCl
 - 1 M Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) (Serva), pH upraveno pomocí HCl (Lachema)
- Trypsin
 - 0,25% Trypsin v PBS
- Versen
 - 0,25% EDTA v PBS

Roztoky a chemikálie používané při práci s proteiny

- Imperial protein stain (Thermo Scientific)
- 5x koncentrovaný Laemmliho pufr
 - 50% glycerol (v/v) (Lachema)
 - 25% β - merkптоethanol (Serva)
 - 5% SDS (w/v) (Sigma-Aldrich)
 - 50 mM Tris-HCl, pH = 6,8 (Serva)
 - 0,005% bromfenolová modř (w/v) (Lachema)
- 5% (w/v) sušené mléko v 1x PBS
- 2% kyselina fosfowoframová (PTA)
- 1x koncentrovaný pufr pro SDS elektroforézu (Running pufr), pH = 8,3
 - 192 mM glycin (Sigma-Aldrich)

- 1% (w/v) SDS (Sigma-Aldrich)
- 25 mM Tris (Serva)
- 1x koncentrovaný pufr pro Western blot (Blotting pufr), pH = 8,3
 - 195 mM glycín (Sigma-Aldrich)
 - 25 mM Tris (Serva)
 - 20% methanol (v/v) (Lachema)
- Jodixanol (Sigma-Aldrich)
- RIPA pufr s SDS
 - 5 mM EDTA
 - 1% kyselina deoxycholová (w/v) (Fluka)
 - 150 mM NaCl (Lachner)
 - 0,05% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich)
 - 0,1% SDS (Sigma-Aldrich)
 - 50 mM Tris-HCl, pH = 7,4 (Serva)
 - 1% Triton X-100 (Serva)
- Vyvolávací roztoky A a B (výsledný roztok byl směs roztoků A a B v poměru 1:1)
 - roztok A – 90 mM kyselina p-kumarová v DMSO (Sigma-Aldrich)
 - 250 mM luminol v DMSO (Sigma-Aldrich)
 - 0,1 M Tris-HCl, pH = 8,5 (Sigma-Aldrich)
 - dH₂O
 - roztok B – 0,02% H₂O₂ (Sigma-Aldrich)
 - 0,1 M Tris-HCl, pH = 8,5 (Sigma-Aldrich)
 - dH₂O

Roztoky a chemikálie používané pro práci s DNA

- 6x DNA loading dye (Thermo Scientific)
- 1x koncentrovaný Tris-acetátový pufr. pH = 8,0
 - 1 mM EDTA-NaOH, pH = 8,0 (EDTA– Serva, NaOH- Penta)
 - 20 mM kyselina octová (Penta)
 - 40 mM Tris-HCl (Serva)
- 0,5x koncentrovaný Tris-borátový pufr (TBE), pH = 8,0
 - 1 mM EDTA-NaOH, pH = 8,0 (EDTA– Serva, NaOH- Penta)
 - 45 mM kyselina boritá (Serva)
 - 45 mM Tris-HCl (Serva)

4.1.4 Enzymy

- DNáza I (Roche)
- Neuraminidaza z *Clostridium perfringens* (Sigma-Aldrich)
- Restrikční endonukleázy – BamHI, HindIII, NotI, MluI (Fermentas)
- RNáza A (Sigma-Aldrich)
- T₄ DNA ligáza (Thermo Scientific)
- Trypsin (Sigma-Aldrich)

4.1.5 Expresní systémy

- Bakulovirový expresní systém – Bac-to-Bac (Invitrogen) systém pro produkci VLP v hmyzích sf9 buňkách
- Savčí expresní systém – systém pro produkci pseudovirionů a virpotérů-in a VP-in v savčích 293TT buňkách

4.1.6 Komerční soupravy a produkty

- 4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 12-well, 20 µl (Bio-Rad)
 - 12 jamkový polyakrylamidový gel využívaný pro proteinovou elektroforézu
- 8-16% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl (Bio-Rad)
 - 15 jamkový polyakrylamidový gel využívaný pro proteinovou elektroforézu
- Bright-Glo Luciferase Assay systém (Promega)
 - Souprava využívána při měření luciferázového signálu
- GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
 - Souprava využívána pro izolaci plasmidové DNA z malého objemu bakteriálních buněk
- GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific)
 - Souprava využívána pro izolaci enkapsidované DNA z pseudovirových částic
- iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)
 - souprava využívána pro kvantifikaci DNA uvnitř částic pomocí metody qPCR
- Imperial™ Protein Stain (Thermo Fisher Scientific)
 - Souprava využívána pro barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu (po SDS-PAGE či po western blotu)
- JetStar 2.0 Endotoxin-free Maxiprep Kit (Genomed)
 - Souprava využívána pro izolaci plasmidové DNA z velkého objemu bakteriálních buněk
- MIDORI^{Green} Advance DNA stain (Nippon Genetics)
 - Souprava využívána jako interkalační barvicí činidlo pro vizualizaci DNA v agarózovém gelu

- NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel)
 - Souprava využívána pro izolaci plasmidové DNA z velkého objemu bakteriálních buněk
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)
 - Souprava využívána k izolaci DNA z agarózového gelu
- Qubit™ Protein Assay Kit (Invitrogen)
 - Souprava využívána pro měření koncentrace proteinů ve vzorku
- Subcellular Protein Fractionation kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific)
 - Souprava využívána pro jemné rozdělení buňky na jednotlivé frakce
- SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific)
 - Souprava využívána jako chemiluminiscenční roztok umožňující detekci proteinů po inkubaci membrány se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou
- SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)
 - Souprava využívána jako chemiluminiscenční roztok umožňující detekci proteinů po inkubaci membrány se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou
- Sypro® Ruby protein blot stain (Invitrogen, USA)
 - Souprava využívána jako fluorescenční barvivo nitrocelulóзовé membrány po metodě „Western blot“
- TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific)
 - Souprava využívána jako transfekční činidlo

4.1.7 Kultivační média

Kultivační média pro bakteriální buněčné linie

- LB médium
 - 1% (w/v) NaCl (Lachner)
 - 0,5% (w/v) Kvasničný lyzát (Biolife)
 - 1% (w/v) Trypton (Biolife)
- LB médium s agarem
 - 1% (w/v) NaCl (Lachner)
 - 0,5% (w/v) Kvasničný lyzát (Biolife)
 - 1% (w/v) Trypton (Biolife)
- SOC médium
 - 20 mM glukóza (Serva)

- 2,5 mM KCl (Lachema)
- 0,5% (w/v) Kvasničný lyzát (Imuna)
- 10 mM MgCl₂ (Lachema) – přidáno těsně před použitím
- 10 mM MgSO₄ (Lachema) – přidáno těsně před použitím
- 10 mM NaCl (Lachner)
- 2% pepton (Biolife)
- Živný agar (TPN médium)
 - 0,5% (w/v) Kvasničný extrakt (Biolife)
 - 0,5% (w/v) NaCl (Lachner)
 - 2% pepton (Biolife)

Kultivační média pro hmyzí buněčnou linii

- Médium bez séra (BSM)
 - TNM-FH (Sigma-Aldrich)
- Médium se sérem
 - TNM-FH (Sigma-Aldrich)
 - 10% FBS (Sigma-Aldrich)
- do média bylo přidáváno 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Gibco, Sigma-Aldrich) (viz kapitola 4.1.1)

Kultivační média pro savčí buněčné linie

- Médium bez séra
 - DMEM médium (Sigma-Aldrich)
 - 100x koncentrovaný roztok neesenciálních aminokyselin (Gibco) (Pro buněčnou linii 293TT)
- Médium se sérem
 - DMEM médium (Sigma-Aldrich)
 - 100x koncentrovaný roztok neesenciálních aminokyselin (Gibco) (Pro buněčnou linii 293TT)
 - 10% fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma-Aldrich)
- Pro 3T6 buňky bylo do média přidáváno 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Gibco, Sigma) (viz kapitola 4.1.1)

- Pro 293TT buňky bylo přidáván Hygromycin B Gold ve výsledné koncentraci v mediu 400 µg /ml (InvivoGen) (viz kapitola 4.1.1)

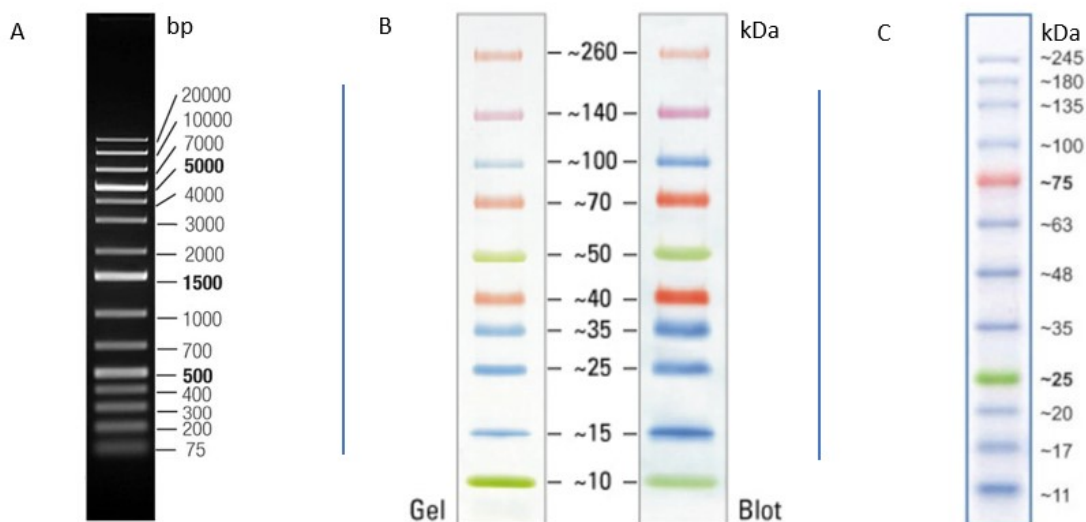
4.1.8 Markery molekulových hmotností

Marker využívaný pro určení velikosti DNA fragmentů

- Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific)
 - standard užívaný pro stanovení délky DNA fragmentů (viz obrázek č.5 A)

Markery využívané pro určení molekulové hmotnosti proteinů

- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher Scientific)
 - Standard užívaný pro kontrolu rozdělení proteinů při SDS-PAGE, pro ověření účinnosti proteinové přesávky a pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů (viz obrázek č.5 B)
- Black Protein Ladder (central european BIOSYSTEMS)
 - Standard užívaný pro kontrolu rozdělení proteinů při SDS-PAGE, pro ověření účinnosti western blotu a pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů (viz obrázek č.5 C)



Obrázek 5 Molekulové markery pro agarózovou a proteinovou SDS-PAGE elektroforézu. A – Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific). B – Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher Scientific). C – Black Protein Ladder (central european BIOSYSTEMS).

4.1.9 Peptidy penetrující membrány

Peptidy využívané pro ko-inkubace s částicemi odvozenými od viru byly syntetizovány společností Synpeptide Co., Ltd s 95% čistotou, s acetylací na N konci a amidací na C konci. CPP byly rozpuštěny v DMSO při 25 mM koncentraci a skladovány při -20°C.

- Sekvence peptidu kH27K – KHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHK
- Sekvence peptidu LAH4 – KKALLALALHHLAHLALHLALALKKAGC
- Sekvence peptidu R8 – CGRRRRRRRR

4.1.10 Primery

Primery využívané pro sekvenování plasmidů pWP-VP1+VP3-KH27K a pWP_VP1+KH27K-tVP3

- SV40-ori-Fw 5' - CCTAACTCCGCCAGTTCC – 3', Tm = 73°C
- EBV-rev 5' - GTGGTTTGTCCAAACTCATC – 3', Tm = 65°C

Primery pro kvantifikaci plasmidu pGL3 control

- Fluc_qPCR_fw2 5' - ATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGT – 3', Tm = 55°C
- Fluc_qPCR_rev2 5' - ATCAGTGCAATTGTCTTGTCCTA – 3', Tm = 55°C

Primery pro kvantifikaci wt MPyV

- MPyV-OriDetection-Fw 5' - CCAGGCCTAGAATGTTTCCA – 3', Tm = 56°C
- MPyV-OriDetection-RV 5' - GATGGTGGTGAGGCTGAAAT – 3', Tm = 56°C

4.1.11 Protilátky

Primární protilátky

- Anti alfa – tubulin
 - myší protilátka proti α -tubulinu, ředěna 100x (Sigma – Aldrich)
- Anti GAPDH
 - králičí polyklonální protilátka proti glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáze, ředěna 5000x (Sigma – Aldrich)
- Anti GRP78 BiP
 - králičí polyklonální protilátka proti proteinu BiP, ředěna 500x (Abcam)

- Anti His Probe (H-3)
 - Myší monoklonální IgG protilátka proti His-tag, ředěna 666x (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti His-Tag (6xHis-Tag)
 - Myší monoklonální IgG protilátka proti His-tag, ředěna 1000x (Invitrogen)
- Anti Kaveolin
 - Králičí polyklonální protilátka proti proteinu kaveolinu, ředěna 1000x (BDBiosciences)
- Anti p62
 - Králičí polyklonální protilátka proti proteinu asociovanému s jaderným pórem p62, ředěna 600x (Abcam)
- Anti VP1 MPyV („anglie“)
 - myší monoklonální protilátka IgG proti denaturovanému proteinu VP1 myšího polyomaviru, ředěna 50x (Forstová et al., 1993)
- Anti VP1 MPyV (D4)
 - myší monoklonální protilátka IgG proti nativnímu proteinu VP1 myšího polyomaviru, ředěna 20x (připravena RNDr. Alenou Drda Morávkovou, MBA, Ph.D.)
- Anti VP2/3 PyV (1A2)
 - Myší monoklonální IgG protilátka proti společné oblasti proteinů VP2 a VP3, ředěna 2x (připravena v Laboratoři virologie)
- Anti VP2/3 PyV (2c8)
 - Myší monoklonální IgG protilátka proti společné oblasti denaturovaných proteinů VP2 a VP3, ředěna 2x (Forstová et al., 1993)

Sekundární protilátky

- GαM-Px
 - Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, ředěna 1000x (BioRad)
- GαRb-Px
 - Kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, ředěna 1000x (BioRad)

4.1.12 Software

- Blast software (NCBI)
- Fusion FX software (Vilber)
- GraphPad

- ImageJ
- itTEM 5.1 (Olympus soft imaging solutions GmbH)
- LightCycler® 480 SW 1.5.1 (Roche)
- NanoDrop (Nanodrop Technologies)
- Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems)
- SnapGene (GSL Biotech)

4.1.13 Vektory

- p-MAT-CPP [~2 600 bp] – plasmid nesoucí gen pro modifikovaný protein VP3-KH2K nebo tVP3 KH27K (Invitrogen)

Pomocné plasmidy

- pwP-VP1 [~6 500 bp] – plasmid nesoucí gen pro protein VP1 upraven RNDr. Lenkou Horníkovou, Ph.D. tak, že ATG sekvence v genu pro EGFP byla mutována. Zároveň bylo do této oblasti vloženo restrikční místo pro restrikční endonukleázu MluI a NruI. EGFP gen tak mohl být vystřižen enzymy MluI a NotI a nahrazen insertem z p-MAT-CPP nesoucí gen pro protein VP3 s CPP. Základní plasmid pochází z addgene #22519).
- pwP-VP1-VP3-CPP [~6 500 bp] – plasmid nesoucí gen pro protein VP1 a VP3-CPP. Plasmid pwP-VP1-VP3-KH27K byl připraven v rámci diplomové práce. Plasmidy pwP-VP1-VP3-LAH4 a R8 byly připraveny Mgr. Janou Váňovou a Mgr. Petrem Škvárou. Konstrukce je blíže popsána v kapitole výsledků (kapitola 5.2), základní plasmid pochází z addgene #22519.
- pwP-VP1-CPP-tVP3 [~6 200 bp] – plasmid nesoucí gen pro protein VP1 a CPP-tVP3. Plasmid pwP-VP1-KH27K-tVP3 byl připraven v rámci diplomové práce. Plasmidy pwP-VP1-LAH4-tVP3 a R8 byly připraveny Mgr. Janou Váňovou a Mgr. Petrem Škvárou. Konstrukce je blíže popsána v kapitole výsledků (kapitola 5.2), základní plasmid pochází z addgene #22519.
- ph2-VP1 [7 854 bp] – plasmid nesoucí gen pro protein VP1 a VP2 upraven RNDr. Hanou Španielovou, Ph.D. Konstrukce je blíže popsána v kapitole výsledků (kapitola 5.2), základní plasmid pochází z Addgene #22520.
- ph3ß [7 262 bp] – plasmid nesoucí gen pro protein VP3. Konstrukce je blíže popsána v kapitole výsledků (kapitola 5.2), základní plasmid pochází z Addgene #22521.

Reportérový plasmid

- pGL3-control [5 256 bp] – plasmid nesoucí gen pro enzym luciferázu za SV40 promotorem. Plasmid kóduje gen pro rezistenci na ampicilin. (původ Clontech)

4.1.14 Virová inokula

- Expresní rekombinantní bakulovirus produkující majoritní kapsidový protein VP1 myšího polyomaviru (MPyV VP1 VLPs) připravený RNDr. Jiřinou Žáčkovou Suchanovou, Ph.D. (BG kmen, GenBank: AF442959)

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace

Veškeré laboratorní nádoby, používané roztoky a laminární boxy bylo nutné před použitím sterilizovat. Laboratorní roztoky a plastové pomůcky, jako například špičky na pipety, byly sterilizovány v autoklávu 0,5 hodiny, při teplotě 127°C a tlaku 120 kPa. Roztoky, které není možné sterilizovat v autoklávu, byly sterilizovány filtrací přes 0,22 a 0,45 µm póry. Chemické nádoby bylo po utěsnění víčkem z alobalu sterilizováno suchým horkým vzduchem 3 hodiny při teplotě 180°C. Mikrobiologické hokejky, pinzety a kulatá krycí skříčka byla sterilizována ponořením do ethanolu a následným žiháním v plamenu. Laminární boxy byly desinfikovány vysvícením UV lampou po dobu nejméně 30 minut.

4.2.2 Práce s bakteriálními liniemi

4.2.2.1 Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány buď na plotnách z LB agaru nebo v tekutém médiu se selekčním antibiotikem zvoleným podle toho, jakou rezistenci daný plasmid nesl. Kultivace jak na plotnách, tak v tekutém LB médiu, probíhala ve shodném čase 16 hodin a teplotě 37°C, v případě kultivace v tekutém médiu byla navíc kultivační suspenze třepána při 250 rpm.

4.2.2.1.1 Příprava kompetentních bakterií TOP10 pro elektroporaci

Bakteriální buňky TOP10 byly zaočkovány do 20 ml TPN média a za stálého třepání inkubovány po dobu 16 hodin při teplotě 37°C a 200 rpm. Po 16 hodinách byla na spektrofotometru změřena optická hustota a bakteriální kultura byla zaočkována do 400 ml TPN média tak, aby výsledná hodnota optické hustoty suspenze byla 0,1. Kultura byla opět inkubována při teplotě 37°C a 200 rpm a pravidelně byla měřena její optická hustota, dokud nedosáhla rozmezí 0,5 – 0,7, v té chvíli byla suspenze rozdělena do 8 centrifugačních zkumavek typu Falcon o celkovém objemu 50 ml a centrifugována po dobu 10 min, při 4°C a 3000 x g. Centrifugací byl oddělen pelet obsahující bakterie a supernatant, který byl slit a pelet resuspendován v 50 ml vychlazené sterilní ddH₂O. Následně byla směs opět centrifugována po stejnou dobu 10 min a za shodných podmínek 4°C a 3000 x g, supernatant byl znovu slit, pelet resuspendován ve

25 ml sterilní ddH₂O a suspenze byla spojena do 4 centrifugačních zkumavek typu Falcon. Po centrifugaci za stejných podmínek jako v předchozím kroku byl supernatant opět slit a pelet resuspendován ve 2 ml 10% (v/v) glycerolu a spojen do 2 50-ml centrifugačních zkumavek. Směs byla opět centrifugována za stejných podmínek, supernatant slit a pelet resuspendován v 1 ml 10% (v/v) glycerolu. Takto vzniklá suspenze kompetentních buněk byla rozdělena do mikrozkušavek po 50 či 100 µl, ihned zamražena v tekutém dusíku a uložena do -80°C.

4.2.2.1.2 Transformace kompetentních bakteriálních buněk TOP10 elektroporací

Kompetentní bakteriální buňky uložené v -80°C byly rozmrazeny na ledu, poté byla připravena reakční směs obsahující 45 µl kompetentních bakterií a 1 µl plasmidu (1 až 1000 ng DNA). Suspenze byla inkubována na ledu po dobu 1 minuty, poté převedena do sterilní vychlazené elektroporační kyvety (se vzdáleností elektrod 2 mm) a vložena do elektroporátoru Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad), kde byl ke směsi aplikován puls (25 µF; 2,5 kV; 200 Ω) po dobu 4,9 sekundy. Ihned poté byl do kyvety přidán 1 ml SOC média a směs byla převedena do Erlenmeyerovy baňky, ve které byla inkubována za stálého třepání po dobu 60 min, při 37°C a 250 rpm. Poté byla bakteriální směs vyseta na agarové plotny s příslušným selekčním antibiotikem a plotny byly uloženy na 16 hodin do termostatu s teplotou 37°C.

4.2.2.1.3 Příprava bakteriálních konzerv

Suspenze bakteriálních buněk narostlá v LB médiu přes noc při 37°C byla v mikrozkušavce smísena se sterilním glycerolem (Lachema) tak, aby finální koncentrace glycerolu byla 20% (v/v). Takto připravené bakteriální konzervy byly skladovány při -80°C.

4.2.3 Práce se savčími a hmyzími buněčnými liniemi

4.2.3.1 Savčí buněčná linie 293TT

4.2.3.1.1 Pasážování buněk 293TT

Buňky 293TT pěstované na 6 resp. 10 cm Petriho miskách (PM) v termostatu při 37°C s 5% CO₂ byly pasážovány 2x týdně po dosažení konfluence. Nejdříve bylo z misky odsáto medium a buňky byly opláchnuty 1 ml, resp. 2 ml versenu, ihned po prokývání PM byl versen odsán a k buňkám bylo přidáno 0,5 ml, resp. 1 ml roztoku 0,25% Trypsinu v PBS. Po 5 minutové inkubaci v 37°C byly buňky resuspendovány v předeřátém médiu DMEM s 10% sérem a 1% neesenciálními aminokyselinami a vysety na nové misky v poměru 1:6. Celkový objem činil 6 ml na 6 cm PM, 10 ml na 10 cm PM. Na závěr byl do média přidán Hygromycin B Gold tak, aby jeho finální koncentrace byla 400 µg/ml.

4.2.3.1.2 Transfekce buněk 293TT pomocí TurboFect™ Transfection Reagent

Buňky 293TT byly den před ko-transfekcí zpasažovány a vysety na 6 cm PM v DMEM médiu se sérem a neesenciálními aminokyselinami nikoliv však s antibiotiky. Následně po 24 hodinách byly buňky o přibližné 70% konfluenci transfekovány dle protokolu pro TurboFect™ Transfection Reagent. Transfekční směs obsahující 600 µl DMEM media bez séra, 6 µg DNA (3 ug pomocného a 3 ug reportérového plasmidu, případně dva pomocné plasmidy a jeden reportérový v poměru 1:1:1) a 12 ul transfekčního činidla Turbofect™ (Thermo Fisher Scientific) byla po 20 minutové inkubaci při pokojové teplotě rovnoměrně nakapána na buňky, následně misky byly prokývány a byly uloženy do 37°C inkubátoru na 48 hodin. Vždy bylo transfekováno 26 misek s buňkami – pelety z 25 PM sloužily pro samotnou izolaci pseudovirionů a pelet z poslední zbývající byl využit pro analýzu lyzátu pomocí SDS elektroforézy. Zároveň byla společně s těmito miskami transfekována jedna PM sloužící jako kontrola účinnosti transfekce. Tato miska s buňkami byla transfekována plasmidem nesoucím gen pro GFP, díky němuž mohla být provedena kontrola pomocí fluorescenčního mikroskopu. Po dvou dnech následovalo sklizení transfekovaných buněk mechanickým seškrábáním z povrchu misek, přenesení do 15 ml falkony a centrifugace při 600 x g po dobu 6 minut. Mezitím byly původní misky propláchnuty PBS, aby nedošlo ke ztrátě materiálu. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a pelet byl resuspendován v PBS po oplachu z misek, následovala druhá centrifugace při 600 x g po dobu 7 minut. Supernatant byl znovu odstraněn, získaný pelet se zamrazil a následně byl použit pro izolaci pseudovirionů.

4.2.3.2 Savčí buněčná linie 3T6

4.2.3.2.1 Pasážování buněk 3T6

Buňky 3T6 kultivované na 6 cm Petriho miskách v termostatu při teplotě 37°C s 5% CO₂ byly pasážovány 2x týdně po dosažení konfluency 1:20 – 1:50. Nejdříve bylo z misky odsáto medium a buňky byly opláchnuty 1 ml versenu, ihned po prokývání PM byl versen odsán a k buňkám bylo přidáno 0,5 ml roztoku Trypsin. Po 5minutové inkubaci v 37°C byly buňky resuspendovány v předeřátém médiu DMEM s 10% sérem a vysety na nové misky. Celkový objem činil 6 ml na 6 cm PM.

4.2.3.3 Hmyzí buněčná linie sf9

4.2.3.3.1 Pasážování buněk sf9

Buňky sf9 pěstované na 6 resp. 10 cm Petriho miskách (PM) v termostatu při 27°C s 5% CO₂ byly pasážovány 2x týdně v poměru 1:3 – 1:4. Konfluentně narostlé buňky byly škrabátkem seškrábány z misky, resuspendovány pipetou a vysety na nové misky s TNM-FH médiem s 10% FBS do celkového objemu 6 resp 10 ml.

4.2.3.3.2 Infekce buněk sf9 rekombinantním bakulovirem

Buňky sf9 narostlé do konfluency byly seškrábány ze tří 6 cm misek (resp. Z jedné a půl 10 cm misky), řepipetováno na Ø 15 cm PM s 5 ml bezsérového media a inkubovány v termostatu, dokud se nepřichytily k povrchu PM (20-30 minut). Následně bylo medium odsáto a buňky byly infikovány 3 ml inokula obsahujícím rekombinantní bakulovirus. Infikované buňky byly inkubovány na kývačce při pokojové teplotě po dobu 45–75 min. Poté bylo k buňkám přidáno 20 ml TNM-FH media s 10% sérem a antibiotiky a buňky byly uloženy do termostatu. Po 3-4 dnech od infekce následovalo sklizení infikovaných buněk jejich manuálním seškrábáním z povrchu PM. Médium s buňkami bylo převedeno do 50 ml zkumavky a ty byly centrifugovány 600 rpm po dobu 6 minut. Mezitím byly původní misky opláchnuty PBS. Po centrifugaci byl supernatant slit do sterilní zkumavky a uschován v lednici při 4°C pro další použití jako inokulum, pelet byl resuspendován v PBS a znovu stočen 2000 rpm po dobu 7 minut. Supernatant byl odstraněn, pelet zamražen a následně použit pro izolaci VLP.

4.2.4 Práce s DNA

4.2.4.1 Agarózová DNA elektroforéza

Pro horizontální DNA elektroforézu byl standardně používán 1% (w/v) agarózový gel připravený rozpuštěním agarózy v 1x koncentrovaném TAE či 0,5x koncentrovaném TBE pufru. Do zahřátého roztoku gelu bylo před zatuhnutím přidáno barvicí činidlo MIDORI Green Stain Gel (Nippon Genetics), gel byl následně nalit do elektroforetické „vany“ a byl do něj vložen hřeben pro tvorbu jamek. Po zatuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické aparatury, byl z něj vyjmut hřeben a gel byl přelit příslušným pufrem (TAE či TBE, dle toho, v jakém pufru byla rozpuštěna agaróza). Do jamek byly nanášeny vzorky smíchané s 6x koncentrovanou nanášecí barvou 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) v poměru 5:1 – vzorek:nanášecí barva a také 3 µl markeru (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas). Elektroforetické dělení obvykle probíhalo při napětí 5 V/cm po dobu 40 minut. Poté byl gel vyfocen pomocí přístroje Fusion FX (Vilber).

4.2.4.2 Izolace plasmidové DNA pomocí komerčního kitu

Ze selekčních agarových ploten, na které byla vyseta bakteriální směs, byly náhodně vybrané osamoceně kolonie přeneseny a zaočkovány pomocí sterilního párátko do LB média se stejným selekčním antibiotikem (do 5 ml, pokud se jednalo o minipreparaci, do 100 ml LB média v případě maxipreparace). Směs byla za stálého třepání inkubována v třepačce při 37°C, 250 rpm, po dobu 16 hodin. Následně byla suspenze centrifugována 20 minut při 4°C a 4150 x g, vzniklý supernatant byl slit a sediment použit pro izolaci plasmidové DNA z bakteriálních buněk. Pro izolaci byly používány tři druhy komerčních souprav: GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), JetStar Endotoxin-free

Plasmid Purification Kit Maxiprep (Genomed), NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel). Izolace byla prováděna dle oficiálního protokolu výrobce k dané soupravě.

4.2.4.3 Měření koncentrace DNA

Ke stanovení koncentrace DNA ve vzorku bylo využito spektrofotometru NanoDrop (ND-1000), na jehož měřicí plochu byly dle návodu nanесeny 2 µl příslušného měřeného vzorku. Měřením absorbance při vlnové délce 260 nm byla určena koncentrace DNA. Pomocí poměru absorbance 260/230 a 260/280 byla kontrolována čistota DNA.

4.2.4.4 Restrikční štěpení plasmidové DNA

Pro kontrolu velikosti, kvality a čistoty připravovaných plasmidů bylo prováděno restrikční štěpení plasmidové DNA. Restrikční směs byla připravována dle tabulky číslo 1 a po smíchání všech složek inkubována při 37°C. Pro izolaci požadovaného fragmentu z agarózového gelu po elektroforéze byla připravena restrikční směs obsahující 10 µg plasmidové DNA.

složky restrikční směsi			
plasmid	500 ng	500 ng	10 µg
1x restrikční enzym 1	0,5 U/µg	0,05 U/µg	0,1 U/µg
1x restrikční enzym 2	0,5 U/µg	0,05 U/µg	0,1 U/µg
10x konc. Pufr	1 µl	1 µl	10 µl
ddH ₂ O doplněna do	20 µl	20 µl	100 µl
inkubace	2 hodiny	přes noc	5 hodin

Tabulka 1: Složky restrikční směsi

4.2.4.5 Izolace DNA z agarózového gelu

Po agarózové elektroforéze byla skalpelem pod UV transluminátorem vyříznuta oblast, kam doputovala DNA našeho zájmu. Vyříznutá oblast byla zvážena a DNA byla z gelu izolována pomocí komerční soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) dle pokynů od výrobce.

4.2.4.6 Ligace

Dle protokolu Thermo Fisher Scientific („DNA Insert Ligation (sticky-end and blunt-end) into Vector DNA“) byla připravena ligační směs (tabulka číslo 2), která byla inkubována ve 22°C po dobu jedné hodiny a poté inaktivována 10 min při 65°C.

složky ligační směsi		
	1:1	1:3
Linearizovaný DNA vektor	100 ng	100 ng
DNA inzertu	13,1 ng	39,4 ng
T4 DNA ligáza (Thermo Scientific)	1 U	1 U
10x konc. T4 DNA ligázový pufr	2 µl	2 µl
ddH ₂ O	doplněno do 20 µl	

Tabulka 2: Složky ligační směsi

4.2.4.7 Sekvence DNA

Po vložení inzertů do jednotlivých plasmidových vektorů byly vzniklé produkty kontrolovány pomocí sekvenace prováděné Laboratoří sekvenace DNA v Biocevu na přístroji MiSeq Illumina. Dle požadavků byla sekvenační směs míchána do objemu 8 µl (dle tabulky číslo 3) v 0,2 ml PCR minizkumavkách. Primery používané pro sekvenaci byly EBV-rev a SV40-ori-Fw. Získané výsledky byly dále vyhodnoceny pomocí softwarů Blast (NCBI) a SequenceScanner (Applied Biosystems).

složky sekvenační směsi	
plasmidová DNA	3 ng/ 100 bp
primer (10 µM)	0,5 µl
ddH ₂ O	doplněno do 8 µl

Tabulka 3 Složky sekvenační reakce

4.2.5 Práce s proteiny a jejich charakterizace

4.2.5.1 Dělení proteinů polyakrylamidovou elektroforézou (SDS-PAGE)

Vzorky nanášené na proteinovou elektroforézu byly připravovány buď smícháním vzorku s 5x koncentrovaným Laemmliho pufrem v poměru 4:1 nebo rozpuštěním peletu (například po srážení proteinů methanolem) v 1x koncentrovaném Laemmliho pufru. Následně byly vzorky povařeny v termobločku při 100°C po dobu 5 minut. Pro elektroforézu byly používány buď 4-12% nebo 8-16% komerční gely Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Precast Protein Gels, 15-well (Bio-Rad) nebo gely mnou namíchané (12% spodní – separační gel a 5% vrchní – zaostřovací gel). V případě elektroforézy s komerčními gely, byly gely vloženy přímo do aparatury a přelity 1x „running“ pufrem. Pokud se jednalo o elektroforézu s mnou připravenými gely, bylo nejdříve nutné řádně omytá skla vložit do aparatury pro přípravu gelu pro SDS-PAGE a utěsnit. Dostatečné utěsnění, aby gel neprotekl, bylo vyzkoušeno napipetováním dH₂O mezi obě skla. Voda byla poté filtračním papírem odsána a místo ní byl do aparatury nalit spodní 12% polyakrylamidový gel převrstvený vodou. Po 20-30 minutách, kdy spodní gel zpolymeroval, bylo možné odsát vrchní vrstvu vody a přidat 5% zaostřovací gel, do kterého byl ihned vložen hřeben pro tvorbu jamek. Po zpolymerování vrchního gelu (opět 20-30 minut) byl vyjmut hřeben, skla s gely byla vyndána z aparatury a upevněna do aparatury pro proteinovou elektroforézu (Bio-Rad, Hoefer). Gel byl zalit running pufrem, kterým byly propláchnuty i jednotlivé jamky v gelu, do nichž bylo poté naneseno 10-15 µl vzorku a 4,5 µl markeru Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) či Prestained Protein Ladder (Abcam). Dělení proteinů probíhalo nejprve při napětí 80 V po dobu 30 minut a poté při napětí 140 V po dobu přibližně 90 minut.

4.2.5.2 Přenos proteinů po SDS-PAGE z gelu na nitrocelulózovou membránu

Proteiny z gelu rozdělené pomocí elektroforézy byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu NC-45 (Serva) pomocí metody Western blot. Gel se vzorky z předchozí SDS-PAGE elektroforézy byl vyjmut z aparatury a inkubován 10 minut ve vychlazeném blotovacím pufru, následně byl vytvořen blotovací sendvič složený z houbiček, filtračních papírů typu Whatman, gelu a nitrocelulózové membrány. Přičemž každá část tohoto sendviče byla důkladně namočená do blotovacího pufru a byl dbán důraz na to, aby mezi jednotlivými vrstvami nebyly vzduchové bubliny. Po kompletním složení byl sendvič vložen do blotovací aparatury a samotné blotování probíhalo při konstantním proudu 250 mA 3 hodiny, zároveň byl každých 40 minut doplňován led kolem aparatury. Následovala detekce proteinů pomocí imunologického barvení.

4.2.5.3 Detekce proteinů barvením membrány komerčním roztokem

Po western blotu byla membrána s přenesenými proteiny inkubována 15 minut ve fixačním roztoku 7% kyseliny octové s 10% methanolem, a poté promyta 4x 5 minut v dH₂O. Následně byla membrána inkubována v komerčním vyvolávacím roztoku SYPRO® Ruby Protein Stain (Invitrogen) po dobu 15 minut a posléze promyta 5x 1 minutu v dH₂O. Nakonec byla membrána vyfocena pod UV světlem v přístroji Fusion FX (Vilber).

4.2.5.4 Imunologická detekce proteinů na nitrocelulózové membráně

Membrána s přichycenými proteiny byla po dobu 30 minut blokována roztokem 5% (w/v) sušeného mléka v 1x koncentrovaném PBS. Poté byla membrána zatavena do fólie a inkubována za stálého třepání při pokojové teplotě po dobu minimálně 1 hodiny s příslušnou primární protilátkou ředěnou v 5% sušeném mléce. Následně byla membrána 3x 10 minut promyta v 1x PBS a poté inkubována s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou opět ředěnou v 5% sušeném mléce. Po 30 minutové inkubaci byla membrána znovu promyta stejně jako po primární protilátce. Po promytí byl na membránu nalit vyvolávací roztok A a B v poměru 1:1 (viz tabulka č. 4) či komerční roztok SuperSignal™ West Femto nebo SuperSignal™ West Pico (Thermo Fisher Scientific) a po 30 sekundách byla membrána z roztoku vyjmuta, lehce osušena buniinou. Signál byl detekován a membrána vyfocena pomocí přístroje Fusion FX (Vilber).

vyvolávací roztoky (míseny 1:1)	
Roztok A	Roztok B
0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) (Sigma)	0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) (Sigma)
250 mM Luminol (Sigma)	0.02% (v/v) H ₂ O ₂
90 mM kyselina p-kumarová (Sigma)	
doplněno dH ₂ O	doplněno dH ₂ O

Tabulka 4: Složky směsi vyvolávacího roztoku

V případě potřeby opětovného vyvolání proteinů na membráně jinou protilátkou, byla membrána opláchnuta proudem vody, promyta v dH₂O, a poté původní protilátka inaktivována 15 minutovou inkubací v H₂O₂ v 37°C termostatu, a poté znovu proudem vody a promyvem v PBS a nakonec opětovným blokováním v 5% (w/v) roztoku sušeného mléka.

4.2.5.5 Dot blot

Na nitrocelulózovou membránu (Amersham) byly nakapány 1-4 μl jednotlivých vzorků, které byly po zaschnutí detekovány pomocí protilátek (viz kapitola 4.2.5.4)

4.2.5.6 Měření koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů v roztoku byl použit fluorometr QubitTM a roztoky ze soupravy výrobce (Qubit Protein Assay kit, Invitrogen). Měření proteinů probíhalo dle návodu od výrobce. Pro každý vzorek byl připraven roztok složený z QubitTM pufru a QubitTM činidla v poměru 200:1, takto připravený roztok se přenesl do mikrozkušavek s měřeným vzorkem (1-10 μl) nebo QubitTM standardem (S1, S2, S3, 10 μl) tak, aby výsledný objem činil 200 μl . Směs byla jemně zvortexována a inkubována při pokojové teplotě. Po 15 minutové inkubaci byla za pomoci standardů vytvořena kalibrační křivka a přistoupilo se k samotnému měření koncentrace proteinů ve vzorcích.

4.2.5.7 Příprava sítěk pro elektronovou mikroskopii

Na parafilm byla nanесena jedna kapka vzorku o objemu 8 μl , dále 2 kapky ddH₂O o objemu 100 μl a 2 kapky 2% kyseliny fosfowolframové (PTA), pH 7,0, o objemu 50 μl . Mikroskopická měděná síťka potažená parlodionovou pouhlikovanou membránou byla postupně inkubována na kapkách v pořadí vzorek (10 min), ddH₂O (30 vteřin na jedné, a poté 30 vteřin na druhé kapce), kyselina fosfowolframová (1 minutu na jedné a poté 1 minutu na druhé kapce). Poté byla ze síťky opatrně odsáta přebytečná tekutina pomocí filtračního papíru a síťky se nechaly doschnout při pokojové teplotě. Vzorky na sítkách byly pozorovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM 1200EX a snímány programem iTEM 5.1 (Olympus soft imaging solutions GmbH). Snímky byly vyfoceny za částečné asistence magistry Alžběty Hejtmánkové či magistry Jany Váňové.

4.2.5.8 Srážení proteinů methanolem

K 200 μl vzorku určeného ke srážení bylo přidáno 600 μl methanolu, směs byla krátce promíchána na vortexu a poté bylo přidáno 150 μl chloroformu a znovu promícháno na vortexu. Hned poté bylo přidáno ještě 400 μl demiH₂O a znovu promícháno na vortexu. Následně byla směs centrifugována 5 minut při pokojové teplotě a 13 000 x g. Následně byla odebrána vrchní vodná fáze a ke vzorku bylo přidáno znovu 600 μl methanolu a směs byla opět centrifugována za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Nakonec byl odstraněn veškerý supernatant a proteinový pelet byl při pokojové teplotě ponechán uschnout. Poté byl pelet rozpuštěn ve 20 μl 1x koncentrovaného Laemmliho pufru a vzorky byly denaturovány ve 100°C po dobu pěti minut. Dle potřeby byly vzorky buď hned nanесeny na polyakrylamidový gel před denaturační elektroforézou nebo byly zamrazeny v -20°C pro pozdější použití.

4.2.6 Izolace částic odvozených od viru

4.2.6.1 Izolace VLP z sf9 buněk pomocí ultracentrifugace v CsCl gradientu

Pelet sf9 buněk, získaný sklizením infikovaných buněk rekombinantním bakulovirem, byl rozmražen, resuspendován ve 2 ml 1x koncentrovaného pufru B a sonikován (stolním sonikátorem Qsonica) za účelem narušení buněčných stěn. Sonikace probíhala na ledu celkově v pěti opakujících se cyklech, pulz byl aplikován po dobu 30 s při 20% amplitudě s 20 s pauzami mezi jednotlivými pulzy. Účinnost sonikace byla ověřena mikroskopicky. K suspenzi byly přidány 2 ml 1x pufru B a směs byla následně centrifugována po dobu 15 min při 2600 x g a 4°C. Vzniklý supernatant byl převeden do ultracentrifugačních zkumavek SW41, pelet byl opět resuspendován 1x koncentrovaným pufrem B a znovu stočen jako v prvním kroku. Nově vzniklý supernatant byl převeden do ultracentrifugační zkumavky k původnímu, objem ve zkumavce byl doplněn do 10 ml a přečištěn centrifugací přes sacharózový polštář (viz kapitola 4.2.6.1.1).

4.2.6.1.1 Přečištění vzorku centrifugací přes sacharózový polštář

Suspenze viru podobných částic v pufru B byla podvrstvena 2,5 ml 10% (w/v) roztokem sacharózy v pufru B a ultracentrifugována po dobu 3 hodin při teplotě 4°C a 35000 rpm v rotoru SW41. Vzniklý supernatant byl odstraněn, sediment rozpuštěn ve 2 ml 1x pufru B po dobu minimálně 4 hodin a znovu sonikován.

4.2.6.1.2 Purifikace částic ultracentrifugací v CsCl gradientu

Obsah zkumavky vzniklý po přečištění vzorku centrifugací přes sacharózový polštář (viz kapitola 4.2.6.1.1) byl doplněn pufrem B do celkové hmotnosti suspenze 8 g. Do suspenze bylo přidáno 3,65 g chloridu cesného, směs byla jemně promíchána tak, aby došlo k rozpuštění CsCl. Následně byl změřen refraktometrický index (měl by být roven 1,3645) na Abbého refraktometru. Poté byl vzorek převrstven parafínovým olejem Bayol F a v ultracentrifugačních zkumavkách přesunut do ultracentrifugačních kyvet, které byly proti sobě velmi přesně vyváženy případným doplněním parafínového oleje. Následovala ultracentrifugace po dobu nejméně 20 hodin při 18°C a 35000 rpm v rotoru SW41. Po centrifugaci byla odstraněna vrchní vrstva Bayolu, zkumavky byly opticky zkontrolovány, zda došlo k ustanovení gradientu detekovatelného přítomností proužků obsahujících virové částice. Obsah jednotlivých zkumavek byl rozebrán na 14-15 frakcí o přibližném objemu 0,5 ml do sterilních mikrozkušavek. Obsah každé frakce byl následně charakterizován pomocí refraktometrického indexu a pomocí metody Dot blot (viz kapitola 4.2.5.5), kterou byla ověřena přítomnost proteinu VP1 (případně minoritních proteinů VP2 a VP3). Od všech frakcí bylo odebráno 10 µl na měřicí plochu refraktometru a na základě lomu světla byl změřen refraktometrický index.

4.2.6.1.3 Očištění viru podobných částic od chloridu cesného pomocí dialýzy

Jednotlivé frakce viru podobných částic byly charakterizovány pomocí metody dot blot, následnou imunodetekcí a měřením refraktometrických indexů. Na základě získaných hodnot z těchto metod byly jednotlivé frakce spojeny a převedeny do předem povařených dialyzačních střev (Serva) a zasvorkovány. Dialyzační střeva byla následně vložena do 2 l 1x koncentrovaného pufru B, po 30 minutách byl pufr B slit a vyměněn za čerstvý. Ve vyměněném pufru B byly vzorky za neustálého míchání dialyzovány přes noc ve 4 °C. Po dialýze byly jednotlivé vzorky znovu přečištěny pomocí centrifugace přes sacharózový polštář (viz kapitola 4.2.6.1.1). Vzniklý supernatant byl odstraněn a pelet rozpuštěn ve 400 µl 1x pufru B. Následovala příprava sítěk pro elektronovou mikroskopii (viz kapitola 4.2.5.7), měření koncentrace proteinu (viz kapitola 4.2.5.6) a zamrazení vzorku.

4.2.6.2 Izolace pseudovirových částic z 293TT buněk pomocí ultracentrifugace v CsCl gradientu

Buněčný pelet obsahující pseudovirové částice (pseudoviriony a virportéry-in) po transfekci byl rozmrazen a resuspendován ve 4,5 ml pufru B, poté bylo přidáno 5 ml tetrachlorethylenu (TCE) (Penta). Suspenze byla důkladně protřepána a následně centrifugována při pokojové teplotě po dobu 30 minut a 3000 rpm. Poté byla opatrně odebrána horní vodná fáze obsahující virové částice a přenesena do nových sterilních 15-ml zkumavek. Pro důkladné odstranění TCE byla suspenze znovu centrifugována při pokojové teplotě po dobu 20 minut a 3000 rpm a opět odebrána vrchní vodná fáze do nové 15-ml zkumavky. Následně byla suspenze doplněna pufr B do objemu přibližně 6,5 ml. Mezitím byly připraveny ultracentrifugační kyvety (Beckman) pro rotor SW41 nanesením 2 vrstev CsCl. Nejdříve bylo nanášeno 2,5 ml těžkého 1,4 g/ml CsCl v pufru B a následně byla velmi opatrně nanášena druhá vrstva 2,5 ml lehkého 1,25 g/ml CsCl v pufru B. Na takto připravený gradient byla nanášena buněčná suspenze, která byla následně doplněna pufr B zhruba 2 mm pod okraj kyvety. Kyvety byly vyváženy a ultracentrifugovány v Optima L- 90K (Beckman) v rotoru SW41 při 18 °C po dobu 2,5 hodin a 35 000 rpm v ustáleném vakuu. Po centrifugaci byl gradient rozdělen na 10 frakcí o přibližném objemu 0,6 ml, pro každou frakci byl změřen refraktometrický index zároveň byly jednotlivé frakce charakterizovány pomocí metody Dot blot (viz kapitola 4.2.5.5), a poté sjednoceny. Sloučené frakční skupiny byly dialyzovány do pufru B (viz kapitola 4.2.6.1.3) a charakterizovány měřením koncentrací proteinů (viz kapitola 4.2.5.6) a vizualizací pomocí elektronové mikroskopie.

4.2.6.3 Izolace pseudovirových částic z 293TT buněk pomocí metody Optiprep™ ultracentrifugací v gradientu jodixanolu

Buněčný pelet obsahující pseudoviriony po transfekci byl opláchnut DPBS a byl změřen objem peletu. Následně byl pelet resuspendován v 1,2 – násobku objemu DPBS-Mg (DPBS obsahující

9,5 mM MgCl_2), následně byla přidána neuraminidáza (Sigma-Aldrich) ve finální koncentraci 2U/ml a směs byla inkubována 30 minut při 37°C. Poté byla přidána 1/10 objemu 10% Tritonu X-100 v DPBS, následně byla přidána 1/1000 objemu RNázy A (Fermentas) a nakonec 1/40 objemu 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH=9 a směs byla inkubována při 37°C přes noc. V mezičase byla směs promíchána převrácením zkumavky. Po inkubaci byly vzorky vychlazeny na ledu a centrifugovány 5 min 5000 x g při 4°C. Supernatant byl odebrán do silikonované mikrozkušavky, k peletu byly poté přidány 2 objemy DPBS-Mg. Následně byla směs důkladně resuspendována a centrifugována 5 minut 5000 x g při 4°C, výsledný supernatant byl spojen se supernatantem z předchozího kroku. K peletu byl poté přidán 1 objem DPBS-Mg, směs byla důkladně resuspendována a zamražena při -80°C. Po rozmražení byl vzorek centrifugován 5 minut 5000 x g při 4°C, supernatant byl spojen s předchozími a k peletu byl přidán 1 objem DPBS obsahující 0,8 M NaCl (DPBS-NaCl). Směs byla poté znovu resuspendována a centrifugována stejně jako v předchozích krocích a supernatant byl opět spojen s předchozími. Spojené supernatanty byly poté centrifugovány 10 min při 5000 x g a 4°C, aby se usadily případné zbytky peletu a ihned navrstveny na předpřipravený jodixanový gradient. Mezitím byl připraven 45% (v/v) roztok jodixanolu v DPBS-NaCl a z toho roztoku byly dále naředěny roztoky o koncentracích: 27%, 33%, 39%. Z těchto roztoků byl postupně opatrně navrstven gradient po 0,7 ml od každé koncentrace počínaje 39% jodixanolem u dna do ultracentrifugační zkumavky typu SW55. Po převrstvení gradientu supernatanty, byly zkumavky doplněny DPBS po okraj a vzorky byly ultracentrifugovány 3,5 hodiny při 50 000 rpm a 16°C v rotoru SW55. Roztáčení a zastavování rotoru bylo nastaveno na nízkou rychlost. Jednotlivé vzorky byly rozděleny na 16 frakcí po přibližně 250 μl , přičemž první frakce obsahovala dvojnásobek. Poté byly jednotlivé frakce charakterizovány metodou Dot blot (viz kapitola 4.2.5.5), po zkušenostech s předchozími izolacemi z jodixanového gradientu byly spojeny frakce 2 a 3 obsahující plné částice a ty byly poté používány pro experimenty.

4.2.7 Práce s částicemi odvozenými od viru

4.2.7.1 Kvantifikace zabalené DNA uvnitř pseudovirových částic

4.2.7.1.1 Izolace plasmidové DNA z pseudovirových částic

Od každého vzorku bylo odebráno 200 μl a smícháno s ionty MgCl (ve finální koncentraci 5 mM), 1 μl divokého viru (wt, z anglického *wildtype*) MPyV, který sloužil jako vnitřní kontrola izolace, a DNázou I (Roche, ve finální koncentraci 20 U/ml, DNáza byla předředěna v pufru obsahujícím 10 mM Tris, 0,1 mM CaCl_2 a 2,5 mM MgCl_2). Směs byla inkubována po dobu 30 minut při 37°C, poté byla DNáza inaktivována přidáním EDTY (ve finální koncentraci 5 mM) a směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Veškerá směs byla poté použita pro izolaci plasmidové DNA (pDNA) pomocí komerční

soupravy GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific). Izolace probíhala dle pokynů výrobce.

4.2.7.1.2 Absolutní kvantifikace plasmidové DNA pomocí qPCR

Pomocí qPCR byla změřeno celkové množství reportérového plasmidu pGL3-control uvnitř modifikovaných částic. Vyizolovaná DNA z předchozího kroku byla naředěna 5x, 25x a 125x. Jako templát pro qPCR byly použity 2 µl vzorku všech ředění i vzorku neředěného. Pro vytvoření standardní křivky byl pGL3 plasmid ředěn desítkovou ředící řadou v rozsahu $1,7 \times 10^9$ kopií/µl až $1,7 \times 10^3$ kopií/µl a do reakce přidáván v objemu 2 µl. Celkový objem reakční směsi činil 10 µl (5 µl iQTM SYBR® Green Supermix (BioRad), 300 nM Fluc qPCR fw2 a rev2 primery a 2 µl templátové DNA) (viz tabulka č. 5). Vzorky byly naneseny v tetraplikátech na 384-jamkovou destičku (Roche). Deska se vzorky byla před samotnou qPCR centrifugována po dobu 1 minuty při pokojové teplotě a 1000 x g, a poté vložena do přístroje LightCycler R80 Real-TimePCR (Roche), kde probíhala kvantifikace. Získaná data byla analyzována v softwaru LightCycler® 480 SW 1.5.1 (Roche).

wt MPyV přidaný při izolaci DNA do každého vzorku, sloužil jako vnitřní standard pro získání představ o ztrátovosti izolace. Izolované vzorky DNA proto také podrobeny qPCR detekující přítomnost MPyV DNA (konkrétně oblasti počátku replikace). Vzorky byly ředěné 25x a neředěné, qPCR probíhala za stejných podmínek jako reakce předchozí. Jako primery byly použity primery MPyV-OriDetection-Fw a MPyV-OriDetection-RV s teplotou nasedání primerů nastavenou na 56 °C. Naměřené hodnoty 25x ředěného vzorku byly použity pro stanovení ztrát v průběhu procesu izolace DNA a výsledné hodnoty kvantifikace pDNA byly vynásobeny koeficientem ztrát. Finální experimenty prezentované ve výsledkové části byly provedeny Mgr. Janou Vánovou.

složky qPCR směsi	
templát	2 µl
SYBR GREEN mix	5 µl
Primer 1 [c= 300 nM]	0,6 µl
primer 2 [c= 300 nM]	0,6 µl
dH ₂ O doplněna do	10 µl

Tabulka 5: Složky qPCR reakce

	nastavení PCR cyklu		
	Počet cyklů	Teplota	Doba trvání
preinkubace	1x	94°C	10 min
amplifikace	40x	94°C	20 s
	40x	58°C/56°C	15 s
	40x	72°C	20 s
chlazení	1x	40°C	45 s

Tabulka 6: Nastavení PCR cyklu

4.2.7.2 Měření luciferázové aktivity

4.2.7.2.1 Příprava buněk a pseudoinfekce

293TT buňky vyšetě na Petriho miskách byly opláchnuty Versenem, 5 minut inkubovány při 37°C s trypsinem a poté resuspendovány v kompletním médiu. Po spočítání v Bürkerově počítací komůrce byly buňky naředěny v kompletním čirém médiu a po 100 µl naneseny na čirou 96- jamkovou destičku (Gama Group) ve výsledné koncentraci 40 000 buněk na jamku. Během tří hodinové inkubace v termostatu s 37°C a 5% CO₂ byly v kompletním čirém médiu naředěny pseudoviriony na vstupní množství 10 ng pDNA (plasmidové DNA). Po třech hodinách od vyšetí buněk na destičku byly předředěné vzorky nanášeny v tetraplikátech po 100 µl do jednotlivých jamek. Do jamek, které sloužily jako „blank“ bylo přidáno pouze 100 µl samotného média, jamky, které představovaly negativní kontrolu, obsahovaly kromě 100 µl buněk v médiu i 100 µl kompletního čírého média. Buňky byly po pseudoinfekci ponechány 72 hodin v termostatu s 37°C, 5% CO₂ a zvýšenou vlhkostí vzduchu.

4.2.7.2.2 Luciferázový test

Po 72 hodinách od pseudoinfekce byly destičky se vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při 500 x g, poté bylo z jamek odstraněno médium a do každé jamky bylo přidáno 160 µl DPBS (Sigma-Aldrich).

Následně byly destičky pro destrukci buněk 3x zmrazeny a rozmrazeny. Posléze byly vzorky resuspendovány a vzorky v tetraplikátech nanесeny po 100 µl na bílou 96- jamkovou destičku určenou pro luciferázový test (Thermo Fisher Scientific). Ke každému vzorku bylo přidáno 100 µl substrátu obsahujícího luciferin (Bright-Glo™ Luciferase Assay Reagent, Promega) a následovala tři minutová inkubace při pokojové teplotě. Reakcí enzymu luciferázy, exprimované z reportérového plasmidu (zabaleného v modifikovaných i nemodifikovaných virových částicích) kódujícího gen právě pro luciferázu, a substrátu luciferinu, docházelo k biochemické reakci bioluminiscenci. Po inkubaci byla destička se vzorky vložena do přístroje Thermo Scientific Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific), jež měřil míru bioluminiscence, která byla úměrná množství produkované luciferázy v infikovaných buňkách. Finální experimenty prezentované ve výsledkové části byly provedeny Mgr. Janou Váňovou.

4.2.7.2.3 BCA test pro stanovení proteinové koncentrace

V každém z měřených vzorků při luciferázovém testu bylo stanoveno množství proteinů pomocí metody BCA. Po úvodním zmrazování, rozmrazování a resuspendování vzorků bylo 20 µl každého vzorku přeneseno do čiré 96-jamkové destičky (Gama Group) a měření koncentrace vzorků probíhalo dle pokynů výrobce. Hodnoty luciferázového testu (v luciferázových jednotkách) byly vztaženy na naměřené množství proteinů v jednotlivých jamkách (mg proteinu), čímž vznikla jednotka RLU/mg proteinu, tedy relativní luciferázová jednotka na mg proteinu, která je jednotkou ve které jsou vyneseny všechny prezentované grafy.

4.2.7.3 Frakcionace 3T6 buněk pseudoinfikovaných pseudovirovými částicemi

Pro určení v které části buňky jsou lokalizovány pseudovirové částice, byla využívána metoda frakcionace. Frakcionace probíhala dvěma způsoby. Prvním z nich bylo rozdělení buňky pouze na frakci *Cytosol* a frakci *Rest* pomocí digitoninu, druhý způsob zahrnoval rozdělení buňky pomocí komerční soupravy Subcellular Protein Fractionation kit for Cultured Cells (ThermoFisher Scientific) na frakci cytosolickou, membránovou, jadernou a cytoskeletární. Zároveň bylo při frakcionaci oběma způsoby kontrolováno vstupní množství, a také částice, které byly ve chvíli ukončení experimentu a „sklizení“ buněk přichycené na buněčném povrchu, ale nevstoupily do buňky.

První den experimentu bylo z misky s narostlými buňkami odsáto médium, přidán 1 ml Versenu, který byl ihned odsán a bylo přidáno 0,5 ml Trypsinu. Buňky byly uloženy na 5 min do 37°C termostatu, poté bylo přidáno 5 ml média se sérem. Posléze byly buňky resuspendovány a přeneseny do 50-ml zkumavky typu Falcon a vysety na šesti jamkovou destičku v koncentraci 3×10^5 buněk na jamku. Následující den byly připraveny virové částice pro infekci buněk krátkým sonikováním a namícháním vstupní směsi o koncentraci a) 15 µg částic v 0,5 ml BSM, b) 15 µg částic + 20 µM CPP v 0,5 ml

BSM – směs byla společně ko-inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě, c) samotné CPP v 0,5 ml BSM ve výsledné koncentraci 20 uM, d) samotné BSM – sloužilo jako negativní kontrola „*mock infekce*“. Po namíchání vstupního vzorku bylo ihned odebráno 20 ul suspenze, ke které bylo přidáno 5 µl 5x koncentrovaného Laemmliho pufru pro kontrolu vstupního množství na gel a směs byla 5 minut povařena (=vstupní materiál/*Input*). Poté bylo od buněk odsáto medium, buňky byly opláchnuty BSM a následně byly přidány vzorky a negativní kontrola. Buňky se vzorky byly inkubovány 20 min na kývačce, poté 40 min v termostatu s občasným pokýváním. Po hodinové inkubaci byl přidán 1 ml média (se sérem v případě frakcionace pomocí digitoninu či bezsérového média v případě frakcionace pomocí komerční soupravy) a vzorky byly inkubovány 3 hodiny při 37°C v termostatu. 4 hodiny po infekci bylo odebráno médium, přidáno 390 µl směsi Versenu a Trypsinu a po 5 minutách, při kterých byly buňky v termostatu, bylo přidáno i 390 µl inhibitoru Trypsinu. Ihned poté byly jednotlivé vzorky přeneseny do předem vychlazených mikrozku mávek, které byly následně 5 min centrifugovány při 4°C a 500 x g. Ve vzniklém supernatantu byly vzorky, které byly přichyceny na buněčném povrchu, ale nevstoupily dovnitř, supernatant byl odebrán a přesrážen methanolem (viz kapitola 4.2.5.8), tato frakce je označována jako *Surface*.

Další postup frakcionace se lišil podle toho, zda se jednalo o frakcionaci pomocí komerční soupravy nebo digitoninu. V případě komerční soupravy byly vzorky drženy na ledu a frakcionace probíhala dle oficiálního pracovního protokolu výrobce s rozdělením buňky na frakci solubilní cytosolickou, membránovou, solubilní jadernou, chromatinovou (solubilní jaderná a chromatinová byly po frakcionace spojeny a následně analyzovány dohromady, výsledná frakce je tedy nazývána souhrnně „jaderná“) a cytoskeletární.

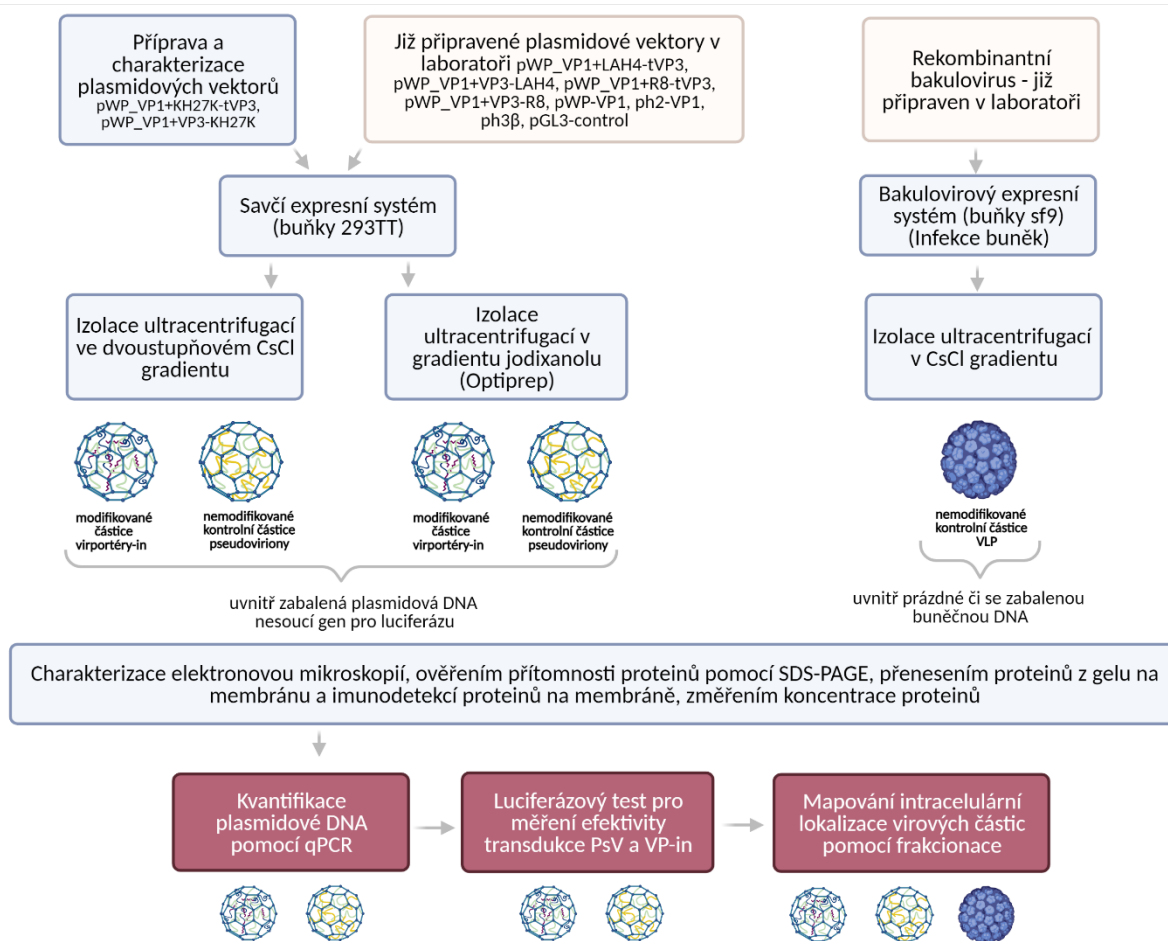
U frakcionace pomocí digitoninu byl pelet získaný v předchozím kroku resuspendován v 50 ml PBS s inhibitory proteáz, poté bylo přidáno 50 ml PBS s digitoninem (jehož výsledná koncentrace byla 80 µg/ml) a suspenze byla inkubována 10 minut na ledu a poté 15 min centrifugována při 4°C a 16000 x g. Vzniklý supernatant byl odebrán a později sloužil jako frakce *Cytosol*. Pelet byl resuspendován ve 100 µl RIPA pufru s SDS, inkubován 20 minut na ledu a sonikován, tato část představovala frakci *Rest*.

Všechny frakce, vstupní materiál a část, která byla ošetřena trypsinem, a tedy odstraněna z povrchu buňky, byly naneseny na polyakrylamidový gel, pomocí SDS elektroforézy byly jednotlivé proteiny rozděleny, přeneseny na nitrocelulóзовou membránu pomocí proteinové přesávky. Poté byl v jednotlivých frakcích detekován VP1 protein jakožto marker přítomnosti částic uvnitř dané frakce, a zároveň byly membrány analyzovány na přítomnost jednotlivých markerů daných frakcí (Markerem pro cytosolickou frakci bylo GAPDH, Markerem membránové frakce byl BiP (GRP78) a/nebo kaveolin, markerem jaderné frakce byl p62, markerem frakce cytoskeletární byl tubulin).

5 VÝSLEDKY

Cílem této práce bylo navrhnout, produkovat, vyizolovat a otestovat modifikované částice odvozené od myšího polyomaviru (Virportery-in, zkráceně VP-in), které by proti standardní nemodifikované částici měly zvýšenou transdukční schopnost a lépe unikaly z endolysosomálních váčků. Navržené modifikace se vždy týkaly připojení peptidu penetrujícího membrány (CPP) na C či N konec minoritního kapsidového peptidu VP3 pomocí genetických úprav, tedy kovalentně.

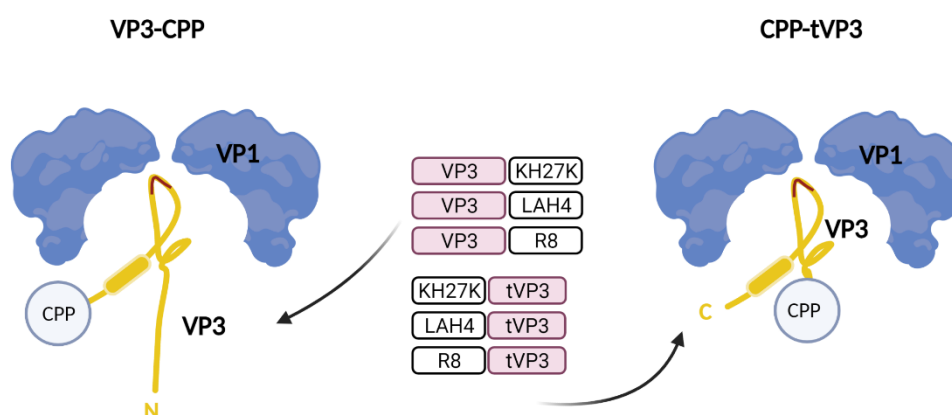
Kromě kovalentní modifikace VP3 proteinu byla také testována možnost ovlivnění transdukční schopnosti virových částic pomocí nekovalentní asociace CPP, tedy pomocí prosté ko-inkubace CPP s nemodifikovanými virovými částicemi bez genetických úprav. Posloupnost kroků experimentální práce diplomového projektu je znázorněna na obrázku č.6.



Obrázek 6: **Schéma diplomového projektu.** Metodami genového inženýrství byly připraveny plasmidové vektory pWP_VP1+KH27K-tVP3 a pWP_VP1+VP3-KH27K, zbylé plasmidové vektory využit v této práci byly již hotové v laboratoři. Zároveň byl využit rekombinantní bakulovirus nesoucí gen pro protein VP1, který byl již v laboratoři hotov též. Pro produkci částic byl využíván savčí expresní systém (v buňkách 293TT) a systém bakulovirový (v buňkách sf9). Kotransfekcemi buněk jednotlivými plasmidy byly produkovány modifikované částice virpotéry-in a nemodifikované pseudoviriony. Oba typy částic byly poté izolovány i) pomocí ultracentrifugace ve dvoustupňovém CsCl gradientu a ii) ultracentrifugací v gradientu jodaxinolu (Optiprep). Bakulovirový expresní systém umožňoval produkci nemodifikovaných částic VLP po infekci rekombinantním bakulovirem. VLP byly následně izolovány pomocí ultracentrifugace v gradientu CsCl. Virportéry-in a pseudoviriony vznikaly kotransfekcemi za účasti plasmidu pGL3-control, který nese gen pro luciferázu a je přibližně stejně velký jako virový genom, virové částice tak vznikaly se zabaleným pGL3-control plasmidem (pDNA). VLP byly naopak prázdné či se zabalenou buněčnou DNA pocházející z buněk sf9. VLP, pseudoviriony i virportéry-in byly následně charakterizovány. Posléze probíhaly finální experimenty pomocí kterých bylo i) kvantifikováno množství zabalené pDNA, na základě tohoto údaje byl ii) nastaven experiment pro analýzu efektivity transdukce, iii) a nakonec byla mapována intracelulární lokalizace částic pomocí frakcionace buněk. Vytvořeno pomocí *Biorender.com*

5.1 Uspořádání experimentálního systému

V rámci projektu bylo připraveno několik variant virových částic s CPP, které měly geneticky modifikovaný minoritní kapsidový protein VP3 (viz obrázek č. 7). Ten byl pro tyto účely vybrán proto, že se jedná o zkrácenou formu druhého minoritního proteinu přítomného v částicích – tedy VP2 proteinu. Připojení CPP na plno délkový VP3 protein, a s tím spojené prodloužení tohoto proteinu, by tak nemělo bránit složení kapsidy. Ve všech variantách byla však testována možnost využít zkrácené verze (tVP3) pouze jako kotvy, která zajišťuje umístění CPP dovnitř kapsidy a je tedy pravděpodobně potlačena jakákoliv membránová aktivita samotného VP3 proteinu.



Obrázek 7: **Varianty modifikace proteinu VP3 jednotlivými CPP (KH27K, LAH4, R8).** VP3-CPP značí modifikaci VP3 proteinu připojením CPP na C konec proteinu. CPP-tVP3 značí modifikaci zkráceného proteinu VP3 připojením CPP na N konec proteinu. Vytvořeno pomocí *Biorender.com*

Modifikované virové proteiny CPP

Sekvence modifikovaného minoritního proteinu VP3 příslušnými CPP byly navrženy RNDr. Hanou Španielovou, Ph.D. Veškeré modifikované proteiny byly navrženy s unikátními restrikčními místy pro endonukleázy MluI a NruI na začátku sekvence a s restrikčními místy NotI a SphI na jejím konci. Sekvence byly syntetizovány na zakázku společností Thermo Fisher Scientific jako součást plasmidového vektoru pMA-T firmy Invitrogen.

Sekvence aminokyselin veškerých navržených VP3 s CPP jsou vypsány níže. Sekvence VP3 proteinu byla většinou (v případě peptidu navázaného na N konec tVP3) modifikována přidáním CPP v místě, které je označeno hvězdičkou tak, že sekvence „GASSVSSG“ (označena světle modře) byla zaměněna za „GGGSGGGT“, která tak vytvořila flexibilní spojník s Kpn I místem (podtrženo) pro další možnosti klonování. **Rudě** je poté označeno vazebné místo pro VP1. **Šedě** je vyznačen jaderný lokalizační signál. **Zelenou** barvou je označen linker spojující peptid s C koncem VP3. Jednotlivé sekvence CPP (KH27K, LAH4 a R8) jsou označeny **tmavě modře** (KH27K), **oranžově** (LAH4) a **tmavě zeleně** (R8).

Aminokyselinová sekvence nemodifikovaného VP3 proteinu

```
MALIPWRDPALLDIYFPGVNQFAHALNVVHDWG HGLLHSVGRYVWQMVVQETQHRLEGAVRELTVR  
QTHTFDGLARLLENTRWVVSNA PQSAIDAINR*GASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGS  
MGNGGPTPAAHIQDESGEVIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDPQKKKRRL
```

Aminokyselinová sekvence KH27K-tVP3

```
MKHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHKGGGSGGGTYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRI  
EGSMGNGGPTPAAHIQDESGEVIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKK  
KRRL
```

Aminokyselinová sekvence VP3-KH27K

```
MALIPWRDPALLDIYFPGVNQFAHALNVVHDWG HGLLHSVGRYVWQMVVQETQHRLEGAVRELTVR  
QTHTFDGLARLLENTRWVVSNA PQSAIDAINRGASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSM  
GNGGPTPAAHIQDESGEVIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRL  
GGGSGGGGTKHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHK
```

Aminokyselinová sekvence LAH₄-tVP₃

KKALLALALHHLAHLALHLALALKKAGGGSGGGTYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGP
TPAAHIQDESGEVIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRL

Aminokyselinová sekvence VP₃-LAH₄

MALIPWRDPALLDIYFPGVNQFAHALNVVHDWGHGLLHSVGRYVWQMVVQETQHRLEGAVRELTVR
QTHTFLDGLARLLENTTRWVVSNAQSAIDAINRGASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSM
GNGGPTPAAHIQDESGEVIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRL
GGGSGGGGTKKALLALALHHLAHLALHLALALKKA

Aminokyselinová sekvence R8-tVP₃

MRRRRRRRRRRRRCGGGSGGGTYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSMGNGGPTPAAHIQDESGEV
IKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRL

Aminokyselinová sekvence VP₃-R8

MALIPWRDPALLDIYFPGVNQFAHALNVVHDWGHGLLHSVGRYVWQMVVQETQHRLEGAVRELTVR
QTHTFLDGLARLLENTTRWVVSNAQSAIDAINRGASSVSSGYSSLSDYRQLGLNPPQRRALFNRIEGSM
GNGGPTPAAHIQDESGEVIKFYQAPGGAHQRVTPDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRLR
RRRRRRRC

Aminokyselinové sekvence nemodifikovaného a všech modifikovaných VP₃ a tVP₃ proteinů odvozených od MPyV. Sekvence VP₃ proteinu byla většinou (v případě peptidu navázaného na N konec tVP₃) modifikována přidáním CPP v místě, které je označeno hvězdičkou tak, že sekvence „GASSVSSG“ (označena světle modře) byla zaměněna na „GGGSGGGT“, která tak vytvořila flexibilní spojník s Kpn I místem (podtrženo) pro další možnosti klonování. Rudě je poté označeno vazebné místo pro VP1. Šedě je vyznačen jaderný lokalizační signál. Zelenou barvou je označen linker spojující peptid s C koncem VP₃. Jednotlivé sekvence CPP (KH27K, LAH₄ a R8) jsou označeny tmavě modře (KH27K), oranžově (LAH₄) a tmavě zeleně (R8).

Pro složení částice je ale nutná přítomnost majoritního kapsidového proteinu VP₁, proto byly všechny plasmidové konstrukty navrženy tak, aby obsahovaly jak gen pro VP₁ protein, tak také gen pro VP₃ protein s kovalentně připojeným CPP. Důležitou součástí systému je i reportérový vektor, který nese reportérový gen pro luciferázu. Velikost reportérového vektoru musí být stejná jako velikost virového genomu (5,3 kbp) jinak nedochází k efektivnímu zabalení vektoru do vnitřku částic. Pro produkci pseudovirionů v rámci této diplomové práce byl jako reportérový vektor využit plasmid pGL3-Control (Clontech), který má gen pro luciferázu umístěn pod kontrolou regulačních elementů viru SV40, neboť

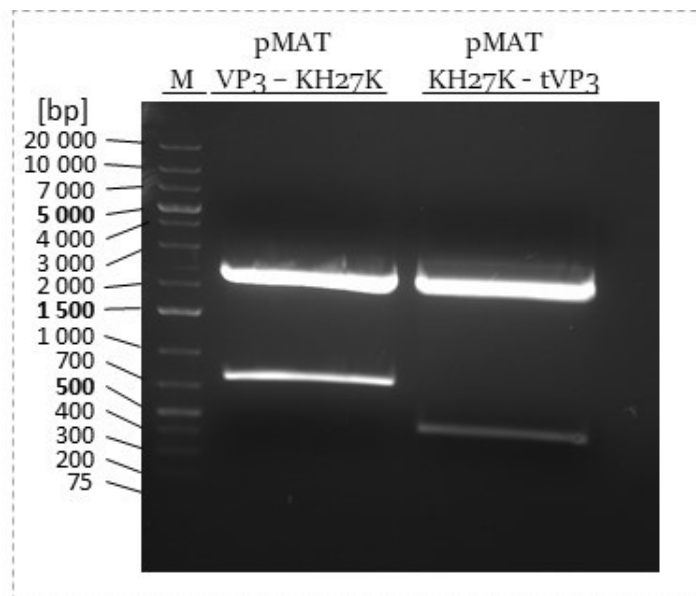
celý systém funguje v buňkách které produkují hlavní regulační protein LT viru SV40, tedy v buňkách 293TT (viz kapitola 4.1.2)

Jako **kontrolní vzorek** pro srovnání účinnosti modifikovaných a nemodifikovaných částic byly produkovány částice – **pseudoviriony** (PsV) - odvozené od MPyV tvořené pouze proteinem VP1 (PsV-VP1), proteinem VP1 a VP3 (PsV-VP1+VP3) a všemi kapsidovými proteiny (PsV-VP1+VP2+VP3). PsV byly produkovány a poté izolovány stejným způsobem jako VP-in.

Dále byly také produkovány **kontrolní částice tvořené v bakulovirovém expresním systému** složené pouze z proteinu VP1 (VLP-VP1).

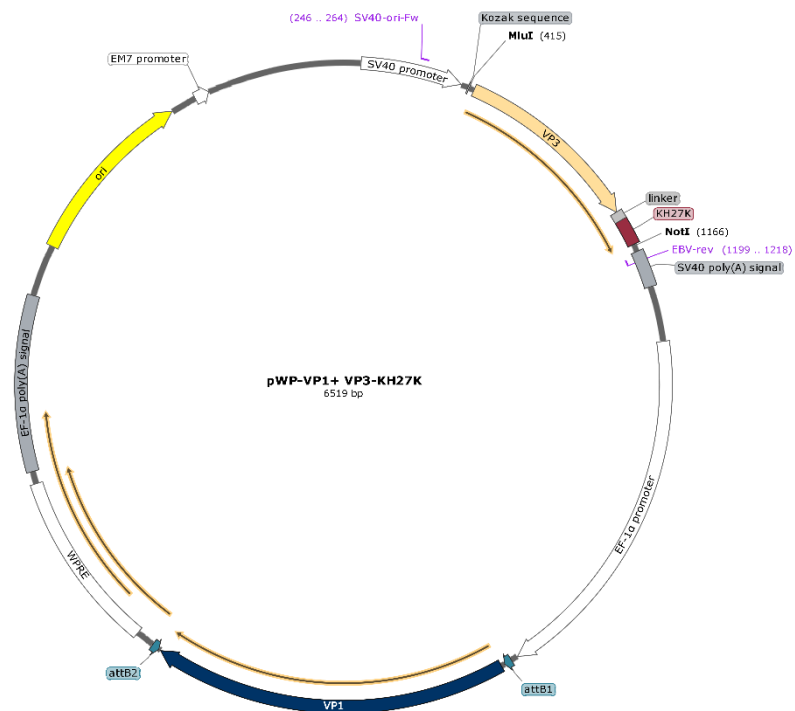
5.2 Příprava, izolace a charakterizace plasmidových vektorů

Pro produkci VP-in částic bylo třeba vložit do bakterií, vyizolovat a restrikním štěpením ověřit na zakázku připravené plasmidy nesoucí geny pro protein VP3 s připojeným KH27K, a následně část s takto modifikovaným VP3 vyštěpit a zaklonovat do plasmidu pwP obsahujícího gen pro protein VP1. Plasmidy nesoucí gen pro VP3 protein s CPP byly elektroporovány do kompetentních TOP10 bakteriálních buněk (viz kapitola 4.2.2.1.1) a vysety na selekční agarové plotny obsahující antibiotikum kanamycin. Plasmid z narostlých kolonií byl vyizolován pomocí komerční soupravy GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) (viz kapitola 4.2.4.2) a ověřen restrikním štěpením endonukleázami Not I a Mlu I (viz kapitola 4.2.4.4). Fragmenty získané restrikním štěpením odpovídaly očekávaným velikostem fragmentů (VP3-KH27K 764 bp, KH27K-tVP3 440 bp) (viz obrázek č. 8), proto byly plasmidy štěpeny znovu ve velkém množství přibližně 9 ug DNA v reakci a fragment obsahující gen pro VP3-KH27K a KH27K-tVP3 byl vyizolován z agarózového gelu pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) (viz kapitola 4.2.4.2).

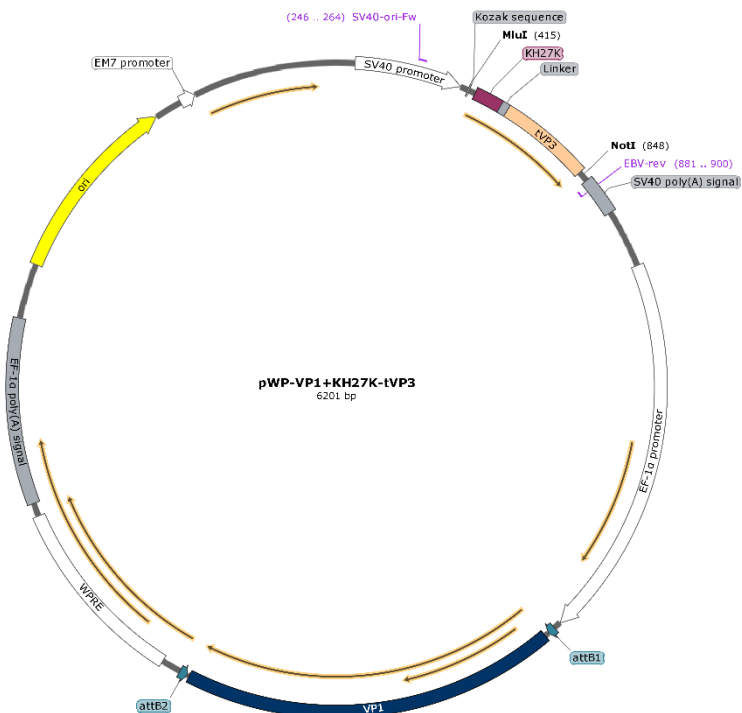


Obrázek 8: Snímek gelu po DNA elektroforéze plasmidů pMAT_VP3-KH27K a pMAT_KH27K-tVP3 štěpených restričními endonukleázami – Vlevo je marker molekulových hmotností (M) Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Poté je plasmid pMAT_VP3-KH27K a pMAT_KH27K-tVP3. Oba plasmidy byly štěpeny endonukleázami Not I a Mlu I, očekávána velikost fragmentu VP3-KH27K byla 764 bp a u KH27K-tVP3 440 bp.

U vyizolované DNA byla změřena koncentrace pomocí přístroje Nanodrop (viz kapitola 4.2.4.3) a fragment se sekvencí kódující modifikovaný VP3 s CPP byl vložen přes restriční místa Mlu I a Not I do plasmidu pwP výměnou za původní EGFP gen (viz kapitola 4.2.4.4). Takto připravené plasmidové konstrukty (pWP-VP1+KH27K-tVP3 a pWP-VP1+VP3-KH27K) byly elektroporovány do kompetentních TOP10 buněk a vysety na selekční agarové plotny obsahující antibiotikum zeocin. Plasmidy z narostlých kolonií byly opět izolovány pomocí komerční soupravy GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) (viz kapitola 4.2.4.2), a zároveň byly vytvořeny bakteriální konzervy (viz kapitola 4.2.2.1.3). Následně byly plasmidy postupně sekvenovány pomocí primerů EBV-rev a SV40-Fw (viz kapitola 4.2.4.7) pro ověření, zda plasmid nese celou sekvenci VP3 s KH27K. Plasmidy, které byly dle sekvenace v pořádku, byly izolovány z velkého objemu bakteriální suspenze pomocí komerční soupravy odstraňující endotoxiny (viz kapitola 4.2.4.2). Posléze byly plasmidy ještě ověřovány restričním štěpením, byla změřena jejich koncentrace, a poté byly používány k transfekci 293TT buněk pro produkci VP-in. Mapa plasmidů pWP-VP1 nesoucích VP3 a KH27K je na obrázcích č. 9 a 10.

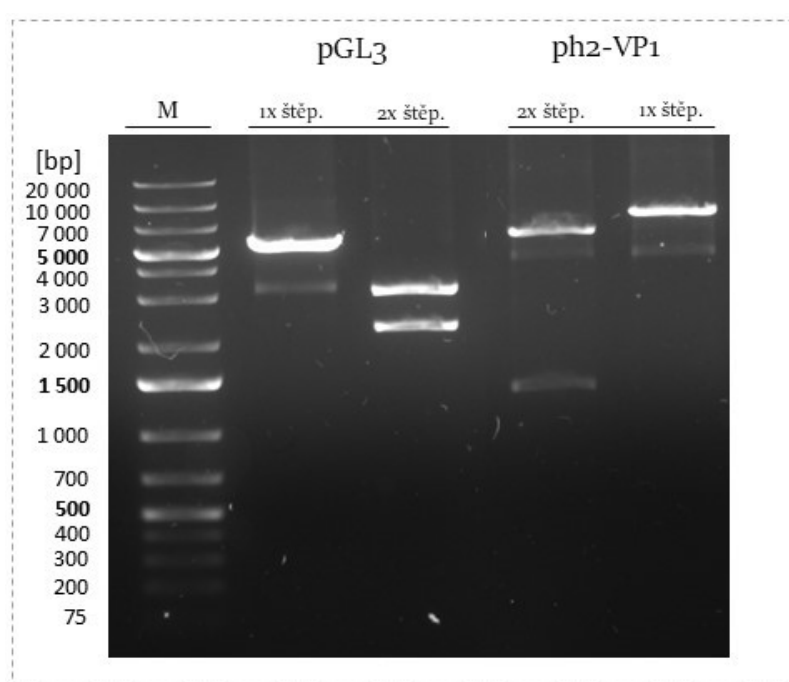


Obrázek 9: Mapa plasmidu nesoucího gen pro protein VP1 a modifikovaný protein VP3 s KH27K napojeným přes linker na C konec VP3 proteinu. Vytvořeno v programu SnapGene



Obrázek 10: Mapa plasmidu nesoucího gen pro protein VP1 a modifikovaný protein VP3 s KH27K napojeným přes linker na N konec VP3 proteinu. Vytvořeno v programu SnapGene

Pomocný ph2-VP1 plasmid používaný pro přípravu kontrolních nemodifikovaných částic a reportérový plasmid pGL3-control byl stejně jako pwP-VP1+VP3-CPP namnožen ve velkém objemu bakteriální kultury a poté izolován pomocí soupravy odstraňující endotoxiny (viz kapitola 4.2.4.2). Stejně tak byla změřena koncentrace plasmidů a plasmidy byly ověřeny restrikním štěpením (400 ng DNA v reakční směsi). Plasmid ph2-VP1 byl štěpen restrikními enzymy EcoRI a NotI, plasmid pGL3-control byl štěpen restrikními endonukleázami BamHI a HindIII za podmínek doporučených výrobcem. Velikost fragmentů u obou štěpených plasmidů odpovídala očekávané velikosti fragmentů (1x štěpený pGL3 5256 bp, 2x štěpený pGL3 3059 bp a 2197 bp, 1x štěpený ph2-VP1 7854 bp, 2x štěpený ph2-VP1 6571 bp a 1283 bp) (viz obrázek č. 11), a plasmidy tedy mohly být využity pro transfekci 293TT buněk.



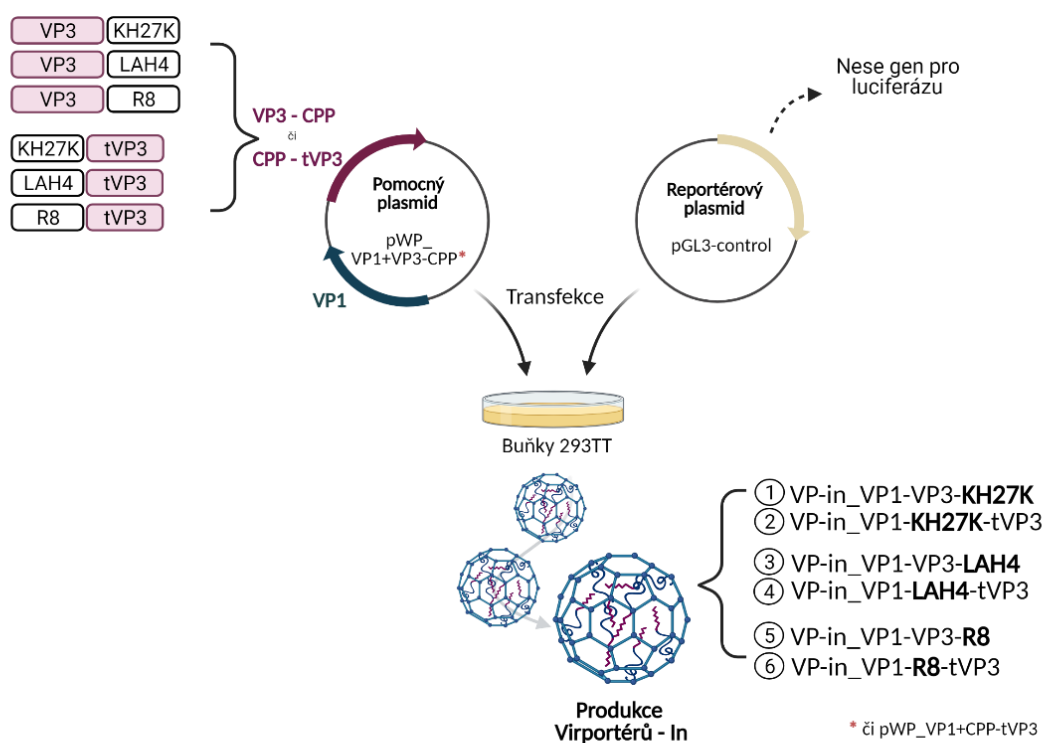
Obrázek 11: Snímek gelu po DNA elektroforéze plasmidů pGL3-control a ph2-VP1 štěpených restrikními endonukleázami – Vlevo je marker molekulových hmotností (M) Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Poté je dvakrát pGL3-control plasmid štěpený restrikními enzymy BamHI a HindIII 1x a 2x. Vpravo je dvakrát pH2-VP1 štěpený EcoRI a NotI 2x a 1x. Očekována velikost 1x štěpeného pGL3 byla 5256 bp a 2x štěpeného 3059 bp a 2197 bp. Očekávaná velikost 1x štěpeného pH2-VP1 byla 7854 bp a 2x štěpeného 6571 bp a 1283 bp)

Pomocné plasmidy pw-VP1+LAH4-tVP3, pwP-VP1+VP3-LAH4, pwP-VP1+R8-tVP3, pWp-VP3+R8 byly připraveny Mgr. Janou Váňovou a Mgr. Petrem Škvárou (Škvára 2020).

5.3 Produkce virpotérů-in a pseudovirionů v savčí buněčné linii 293TT

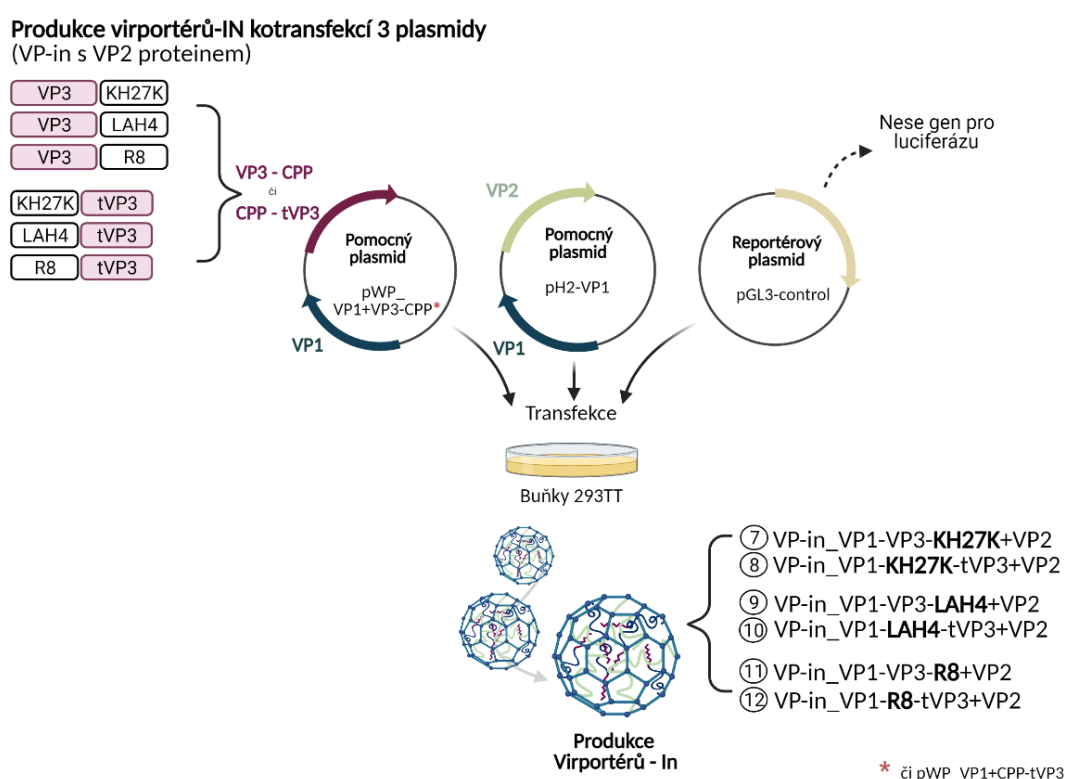
VP-in byly připravovány transfekcí 293TT buněk (viz kapitola 4.2.3.1.2) pomocným plasmidem, nesoucím geny pro protein VP1 a modifikovaný VP3 (pWP_VP1+VP3-CPP nebo pWP_VP1+CPP-VP3), a reportérovým plasmidem pGL3-control, který obsahuje gen pro luciferázu, v poměru 1:1. Tato transfekce dala vzniknout částicím VP-in-VP1+VP3 – CPP a VP-in-VP1+CPP – tVP3, jak je vidět na schématickém obrázku č. 12. Tabulka všech produkovaných částic včetně použitých plasmidů a zvolené metody izolace je v příloze diplomové práce.

Produkce virportérů-IN kotransfekcí 2 plasmidy



Obrázek 12: **Schéma produkce VP-in kotransfekcí 2 plasmidy.** Pro kotransfekce byl používán 1 plasmid pomocný a 1 reportérový. Pomocným plasmidem byl plasmid pWP_VP1+VP3-CPP či pWP_VP1+CPP-tVP3 (nesoucí geny pro VP1 a modifikovaný VP3) a reportérový plasmid byl pGL3-control. Pro transfekce byla používána buněčná linie 293TT. Tímto způsobem byly produkovány virportéry nesoucí protein VP1 a modifikovaný VP3. Uvnitř částic byla zabalená pDNA (plasmid pGL3-control). Vytvořeno dle Mgr. Jany Váňové pomocí Biorender.com.

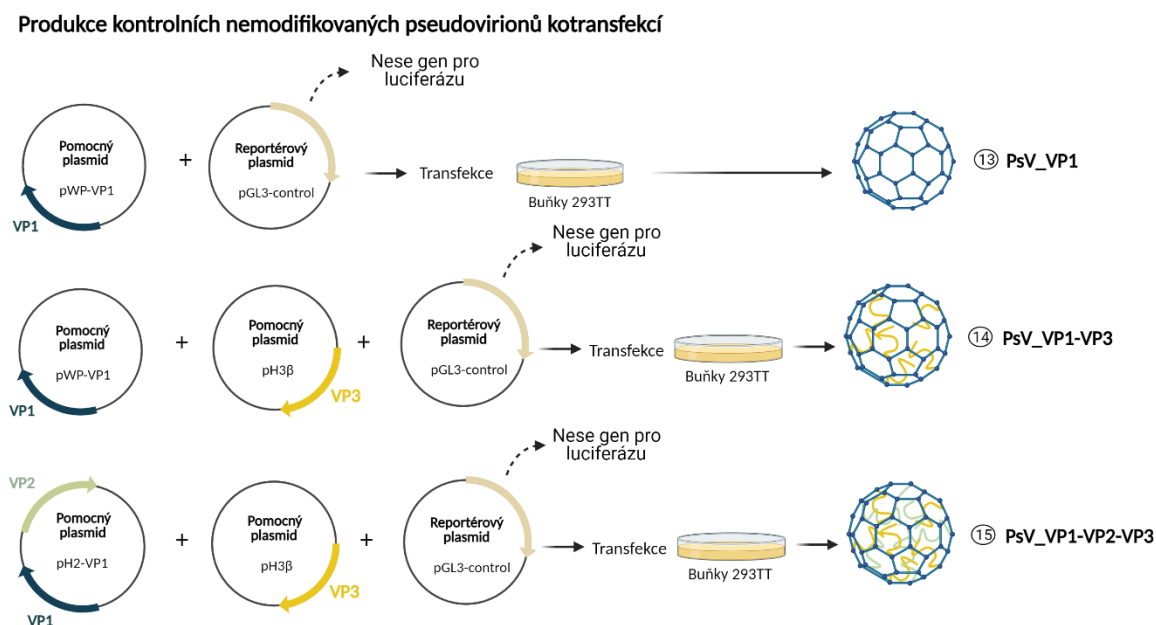
Zároveň byly připravovány virpotéry-in obsahující jak VP1, modifikovaný protein VP3, tak i nemodifikovaný VP2, tedy VP3 – CPP + VP2 nebo CPP – tVP3 + VP2. Tyto částice byly produkovány pro porovnání účinnosti transdukce jak proti variantě pouze s modifikovaným VP3 (bez VP2), tak také proti kontrolním částicím obsahujícím všechny 3 nemodifikované proteiny. V takovémto případě byly ke kotransfekci využívány dva pomocné plasmidy (pWP_VP1+VP3-CPP nebo pWP_VP1+CPP-VP3 a pH2-VP1) a jeden plasmid reportérový (pGL3-control) v poměru 1:1:1, jak je vidět na schématickém obrázku č. 13. Plasmid pH2-VP1 byl připraven úpravou plasmidu ph2p (Addgene #22520) tak, že gen EGFP pod kontrolou SV40 promotoru byl vyměněn za VP1 gen z plasmidu pwP (Addgene #22519).



Obrázek 13: **Schéma produkce VP-in kotransfekcí 3 plasmidy.** Pro kotransfekce byly používány 2 plasmidy pomocné a 1 reportérový. První pomocným plasmidem byl plasmid pWP_VP1+VP3-CPP či pWP_VP1+CPP-tVP3 (nesoucí geny pro VP1 a modifikovaný VP3), druhým pomocným plasmidem byl pH2-VP1 (nesoucí geny pro VP1 a VP2) a reportérový plasmid byl pGL3-control. Pro transfekce byla používána buněčná linie 293TT. Tímto způsobem byly produkovány virportéry nesoucí protein VP1, VP2 a modifikovaný VP3. Uvnitř částic byla zabalená pDNA (plasmid pGL3-control). Vvytvořeno dle Mgr. Jany Váňové pomocí Biorender.com.

Kromě modifikovaných VP-in byly připravovány i kontrolní částice PsV obsahující proteiny VP1, VP1 – VP3, a VP1 – VP2 – VP3 (PsV) (viz schématický obrázek č. 14). Pro produkci **PsV_VP1** byly buňky kotransfekovány plasmidy pWP-VP1 + pGL3-control, pro produkci **PsV_VP1-VP3** byly používány

plasmidy pWP-VP1 + pH3 β + pGL3-control, a pro produkci **PsV_VP1-VP2-VP3** byly užívány plasmidy ph2-VP1 + pH3 β + pGL3-control (viz tabulka v příloze č. 12). Plasmid pH3 β vznikl z plasmidu ph3p (Addgene #22521) tak, že gen EGFP pod kontrolou SV40 promotoru byl vyměněn za gen pro β -galaktosidázu z plasmidu pCMV β (Clontech). Tyto pomocné plasmidy byly navrženy tak, aby jejich velikost významně přesahovala velikost 5,3 kbp a nedocházelo tedy k interferenci mezi enkapsidací reportérového vektoru a pomocným plasmidem produkujícím kapsidové proteiny.



Obrázek 14: **Schéma produkce kontrolních PsV** (vytvořeno pomocí Biorender.com). Pro produkci PsV_VP1 byly používány plasmidy pWP-VP1 a pGL3-control v poměru 1:1. Pro produkci PsV_VP1-VP3 byly používány plasmidy pWP-VP1, pH3 β a pGL3-control v poměru 1:1:1. Pro produkci PsV_VP1-VP2-VP3 byly používány plasmidy ph2-VP1, pH3 β a pGL3-control v poměru 1:1:1. Vytvořeno pomocí Biorender.com.

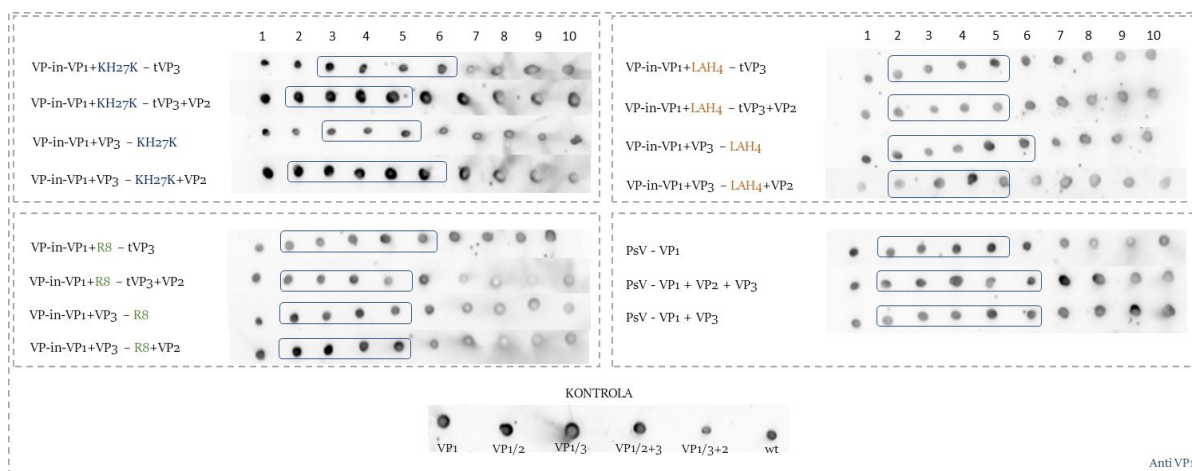
5.3.1 Izolace VP-in a PsV pomocí ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl

Buňky transfekované plasmidy produkující virové částice byly inkubovány 48 hodin v termostatu při 37°C s 5% CO₂. Následně byly buňky mechanickým seškrábáním a centrifugací ve zkumavce sklizeny ve formě peletu, ze kterého byly poté částice izolovány pomocí ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl (viz kapitola 4.2.6.2). K samotné izolaci se přistupovalo vždy ve chvíli, kdy bylo celkově 6 peletů z šesti transfekcí, aby byl kompletně zaplněný rotor centrifugy. Izolace probíhala celkově šestkrát s plně využitým rotorem. Vzniklý gradient byl rozdělen na 10-12 frakcí o přibližném objemu 0,6 ml. Na základě charakterizace frakcí pomocí refraktometrických indexů, u nichž víme, že částice odvozené od polyomaviru se zabalenou DNA se obvykle nachází v rozmezí hodnot $\eta = 1,365 - 1,366$ a prázdné částice při $\eta = 1,362 - 1,363$ (Horníková et al., 2015), a metody Dot blot, pomohla určit přítomnost proteinů VP1 a VP2/3, byly frakce sjednoceny do jedné velké frakce. Při vyhodnocování dat získaných pomocí metody Dot blot byl zohledňován fakt, že zatímco protein VP1 je v částicích na povrchu, tedy nelze rozlišit, zda se jedná o frakci s intaktním či rozvolněným materiálem, u proteinů VP2 a VP3, které by měly být uvnitř částice, silný signál na membráně po vyvolání protilátky proti těmto dvěma proteinům značil spíše rozvolněnou či až rozpadlou kapsidu. Intaktní virová kapsida by tedy měla při nativním Dot blotu zabránit navázání se protilátky na proteiny VP2 a VP3. Naměřené refraktometrické indexy jsou vidět v tabulce č. 7 a výsledek metody Dot blot na obrázku č. 15, 16. Posléze byly sloučené frakce dialyzovány proti pufru B pro odstranění soli (CsCl) (viz kapitola 4.2.6.1.3).

frakce	VP-in - VP1 + KH27K - tVP3	VP-in - VP1 + KH27K - tVP3 + VP2	VP-in - VP1 + VP3 - KH27K	VP-in - VP1 + VP3 - KH27K + VP2		VP-in - VP1 + LAH4 - tVP3	VP-in - VP1 + LAH4 - tVP3 + VP2	VP-in - VP1 + VP3 - LAH4	VP-in - VP1 + VP3 - LAH4 + VP2
1	1.375	1.373	1.373	1.375		1.370	1.3725	1.375	1.360
2	1.376	1.375	1.371	1.375		1.373	1.3725	1.375	1.374
3	1.373	1.374	1.372	1.374		1.372	1.3725	1.375	1.372
4	1.371	1.3705	1.369	1.3705		1.369	1.370	1.371	1.368
5	1.369	1.367	1.366	1.367		1.367	1.3665	1.368	1.365
6	1.366	1.363	1.362	1.364		1.3635	1.363	1.365	1.360
7	1.361	1.360	1.358	1.360		1.360	1.360	1.361	1.354
8	1.356	1.355	1.352	1.355		1.357	1.356	1.357	1.347
9	1.347	1.351	1.460	1.351		1.353	1.352	1.352	1.341
10	1.345	1.345	1.340	1.345		1.349	1.346	1.349	1.336

frakce	VP-in - VP1 + R8 - tVP3	VP-in - VP1 + R8 - tVP3 + VP2	VP-in - VP1 + VP3 - R8	VP-in - VP1 + VP3 - R8 + VP2		PsV - VP1	PsV - VP1 - VP2 - VP3	PsV - VP1 - VP3
1	1.372	1.374	1.376	1.374		1.371	1.376	1.371
2	1.376	1.375	1.374	1.375		1.370	1.376	1.375
3	1.375	1.373	1.372	1.372		1.373	1.375	1.374
4	1.371	1.370	1.369	1.369		1.370	1.371	1.374
5	1.367	1.367	1.366	1.365		1.369	1.368	1.370
6	1.365	1.363	1.362	1.362		1.364	1.365	1.366
7	1.360	1.359	1.357	1.358		1.359	1.362	1.363
8	1.356	1.353	1.355	1.358		1.355	1.357	1.359
9	1.352	1.349	1.348	1.348		1.351	1.352	1.356
10	1.346	1.348	1.342	1.340		1.346	1.348	1.350

Tabulka 7: **Tabulka refraktometrických indexů jednotlivých VP-in a PsV.** V diplomové práci jsou ukázány ilustrační data reprezentující vždy pouze jednu z provedených izolací. Šedě jsou vyznačeny frakce, které se spojovaly do jedné frakce, se kterou bylo pracováno.



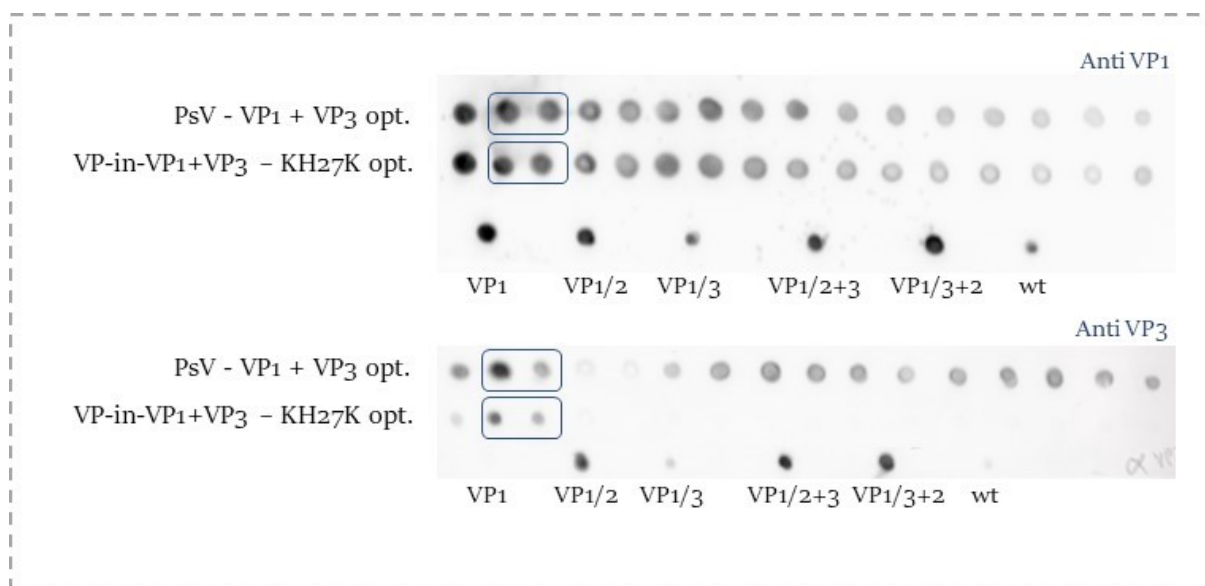
Obrázek 15: **Ověření přítomnosti proteinu VP1 pomocí metody Dot Blot.** Při izolaci VP-in a PsV byly gradienty rozebrány na jednotlivé frakce, které byly ověřovány na přítomnost proteinu VP1. Modře je značeno následné spojení frakcí. Jako kontroly byly použity VLP složené z proteinů VP1, VP1/2, VP1/3, VP1/2+3, VP1/3+2 a wildtype.



Obrázek 16: **Ověření přítomnosti proteinu VP2/3 pomocí metody Dot Blot.** Při izolaci VP-in a PsV byly gradienty rozebrány na jednotlivé frakce, které byly ověřovány na přítomnost proteinu VP2/3. Modře je značeno následné spojení frakcí. Jako kontroly byly použity VLP složené z proteinů VP1, VP1/2, VP1/3, VP1/2+3, VP1/3+2 a wildtype (wt).

5.3.2 Izolace VP-in a PsV pomocí ultracentrifugace v gradientu jodixanolu

V průběhu řešení diplomové práce se ukázalo, že oproti jiným zavedeným postupům, může purifikace virových částic pomocí ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl vést u virových částic ke změně některých biologických charakteristik (byla zaznamenána celkově snížená interakce s buňkami). Proto byly pro srovnání izolovány částice VP-in-VP1-VP3+KH27K a PsV-VP1-VP3 (VP-in-VP1-VP3+KH27K opt. a PsV-VP1-VP3 opt.) také pomocí ultracentrifugace v gradientu jodixanolu (Optiprep™) (viz kapitola 4.2.6.3). Po centrifugaci byly jednotlivé vzorky rozděleny na 10 frakcí po 250 µl, následně byla provedena charakterizace pomocí metody Dot blot (viz obrázek č. 17) a poté byly spojeny frakce 2 a 3 na základě předchozí zkušenosti s touto izolací.



Obrázek 17: **Ověření přítomnosti proteinu VP1 (membrána A) a VP2/3 (membrána B) pomocí metody Dot Blot.** Při izolaci VP-in opt. a PsV opt. byly gradienty rozebrány na jednotlivé frakce, které byly ověřovány na přítomnost proteinu VP2/3. Modře je značeno následné spojení frakcí. Jako kontroly byly použity VLP složené z proteinů VP1, VP1/2, VP1/3, VP1/2+3, VP1/3+2 a wildtype.

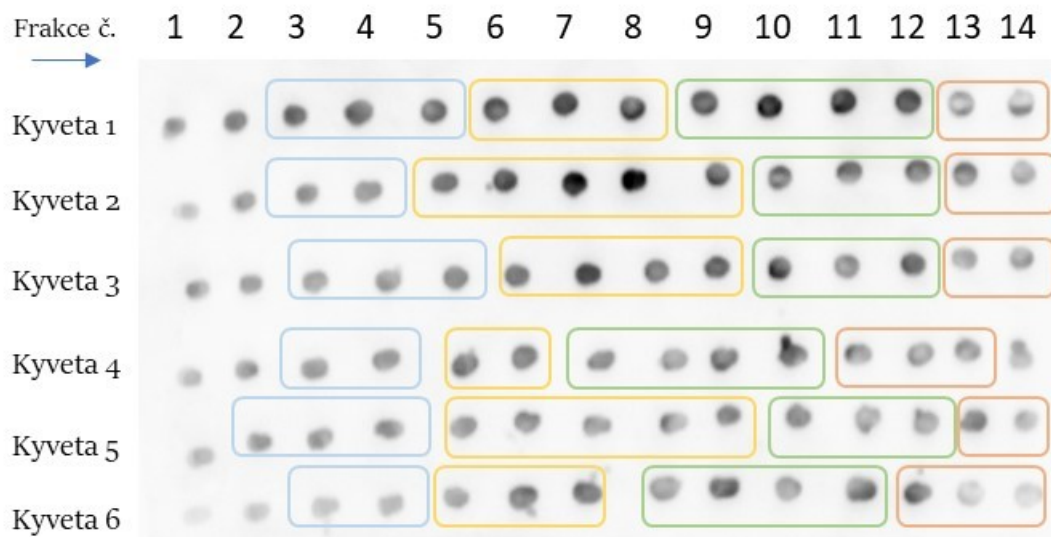
Následná charakterizace probíhala pomocí kombinace metod transmisní elektronové mikroskopie, měření koncentrace proteinů, SDS-PAGE s následným přenosem proteinů na membránu, imunodetekce (viz kapitola 5.5)

5.4 Produkce a izolace VLP pomocí ultracentrifugace v gradientu CsCl

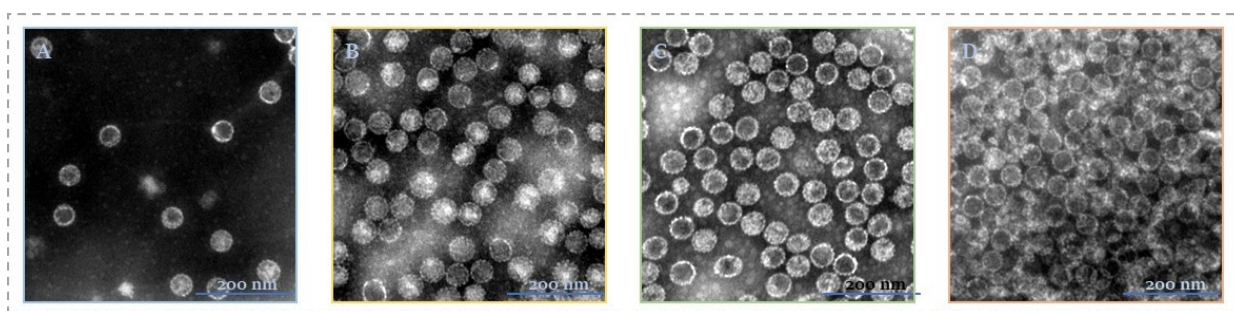
Jako kontrolní částice obsahující pouze protein VP1 byly kromě PsV-VP1 produkovány i virům podobné částice VLP pomocí bakulovirového expresního systému. Pro izolaci VLP byla využita metoda ultracentrifugace v CsCl gradientu, které předcházela lýze buněk sonikací (viz kapitola 4.2.6.1). Po ultracentrifugaci byl gradient rozebrán na jednotlivé frakce, u nichž byl změřen refraktometrický index (viz tabulka č. 8) a přítomnost VP1 byla ověřena pomocí metody Dot blot (viz kapitola 4.2.5.5) (viz obrázek č. 18). Po spojení jednotlivých frakcí do větších celků se srovnatelnými hodnotami refraktometrických indexů byly vzorky dialyzovány proti pufru B a přečištěny přes sacharózový polštář. Následně byla kvalita částic vizuálně zkontrolována pomocí elektronové mikroskopie (viz obrázek č. 19). Ze snímků z EM je patrné, že se podařilo vyizolovat kompaktní a poměrně čisté částice, které mohly být použity do dalších experimentů. Koncentrace vyizolovaného materiálu byla změřena přístrojem Qubit (viz tabulka č. 9).

frakce	kyveta 1	kyveta 2	kyveta 3	kyveta 4	kyveta 5	kyveta 6	
1	1.374	1.373	1.369	1.372	1.374	1.373	
2	1.371	1.372	1.372	1.371	1.37	1.371	
3	1.369	1.369	1.37	1.369	1.369	1.369	Frakce č.1
4	1.367	1.368	1.368	1.367	1.367	1.367	
5	1.367	1.366	1.367	1.366	1.366	1.366	
6	1.365	1.366	1.366	1.364	1.365	1.365	Frakce č.2
7	1.365	1.365	1.365	1.363	1.365	1.364	
8	1.364	1.364	1.364	1.363	1.364	1.363	
9	1.363	1.364	1.364	1.362	1.364	1.363	Frakce č.3
10	1.363	1.363	1.363	1.362	1.362	1.362	
11	1.362	1.362	1.362	1.361	1.362	1.362	
12	1.362	1.362	1.362	1.36	1.362	1.361	Frakce č.4
13	1.36	1.36	1.36	1.359	1.36	1.359	
14	1.359	1.36	1.36	1.357	1.359	1.359	

Tabulka 8: **Tabulka refraktometrických indexů jednotlivých frakcí po rozebrání CsCl gradientu** Při izolaci VLP-VP1 byl gradient rozebrán na jednotlivé frakce, u kterých byl následně měřen refraktometrický index. Modře je značena sloučená první frakce, žlutě sloučená druhá frakce, zeleně frakce třetí a oranžové čtvrtá frakce.



Obrázek 18: **Ověření přítomnosti proteinu VP1 pomocí metody Dot Blot.** Při izolaci VLP-VP1 byl gradient rozebrán na jednotlivé frakce, které byly ověřovány na přítomnost proteinu VP1. Modře je značena sloučená první frakce, žlutě sloučená druhá frakce, zeleně frakce třetí a oranžové čtvrtá frakce.



Obrázek 19: **Snímky VLP-VP1 pořízené z elektronového mikroskopu připravované metodou negativního barvení.** Částice jsou foceny se zvětšením 75 000x. V pravém dolním rohu je měřítko 200 nm. Snímek A je sloučená první frakce, B druhá frakce, C třetí frakce a D čtvrtá frakce. V pravém dolním rohu je znázorněna úsečka reprezentující velikost 200 nm.

Vzorek	proteinová koncentrace	Objem	Výtěžek
1. frakce	82,3 µg/ml	1 ml	82,3 µg
2. frakce	372 µg/ml	1 ml	372 µg
3. frakce	203 µg/ml	1 ml	203 µg
4. frakce	690 µg/ml	1 ml	690 µg

Tabulka 9: **Tabulka naměřených proteinových koncentrací VLP-VP1 u jednotlivých sloučených frakcí.** Koncentrace proteinů byla měřena pomocí fluorometru Qubit (Invitrogen).

Pro následující experimenty byla **používána výhradně druhá frakce VLP-VP1.**

5.5 Charakterizace virportérů-in a pseudovirionů

5.5.1 Stanovení proteinové koncentrace částic

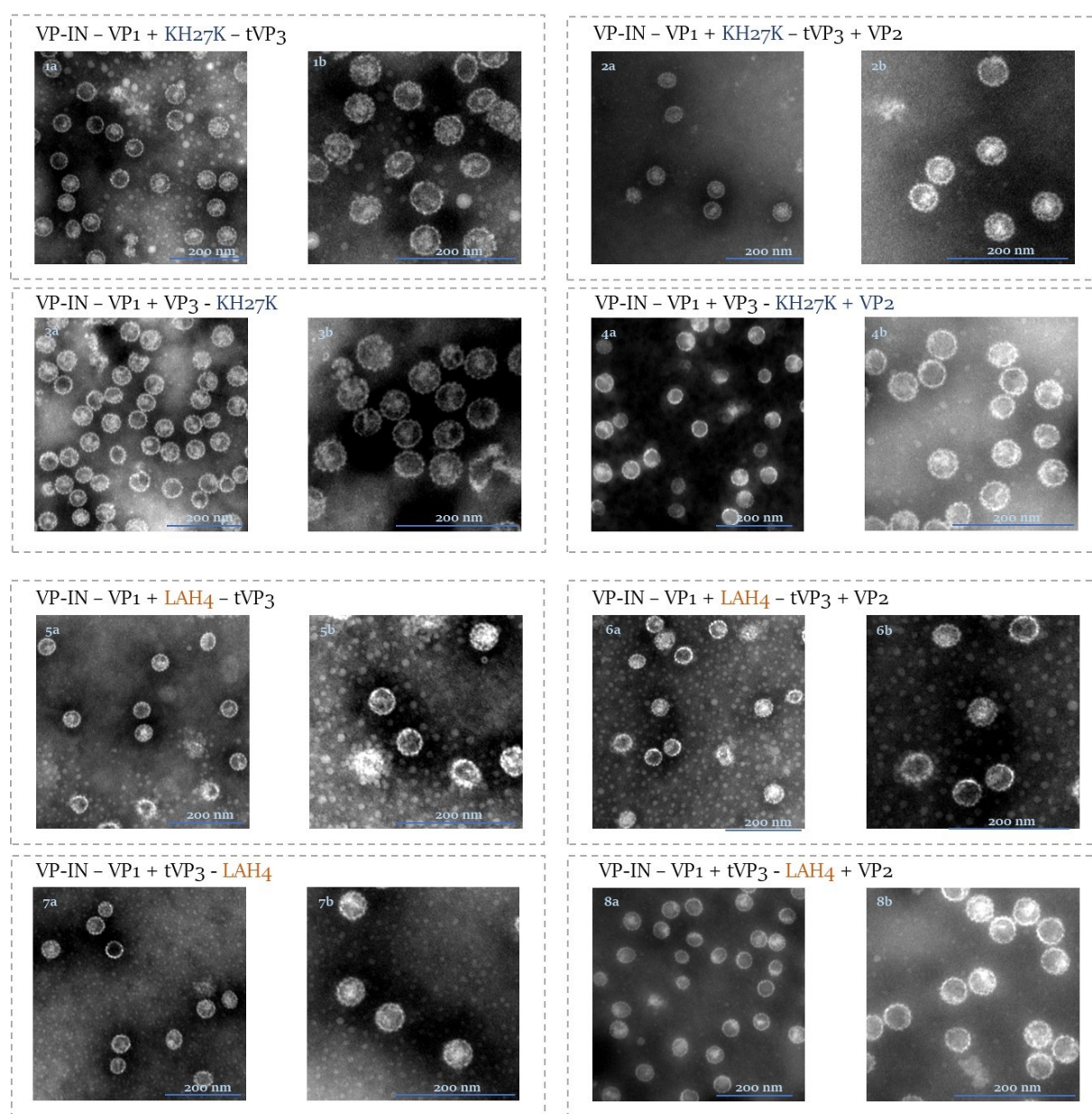
Proteinová koncentrace byla měřena pomocí fluorometru Qubit (Invitrogen) u všech vzorků (viz kapitola 4.2.5.6) (Viz tabulka č. 10). Každý vzorek byl vždy měřen třikrát, finální koncentrace je průměrem tří samostatných měření.

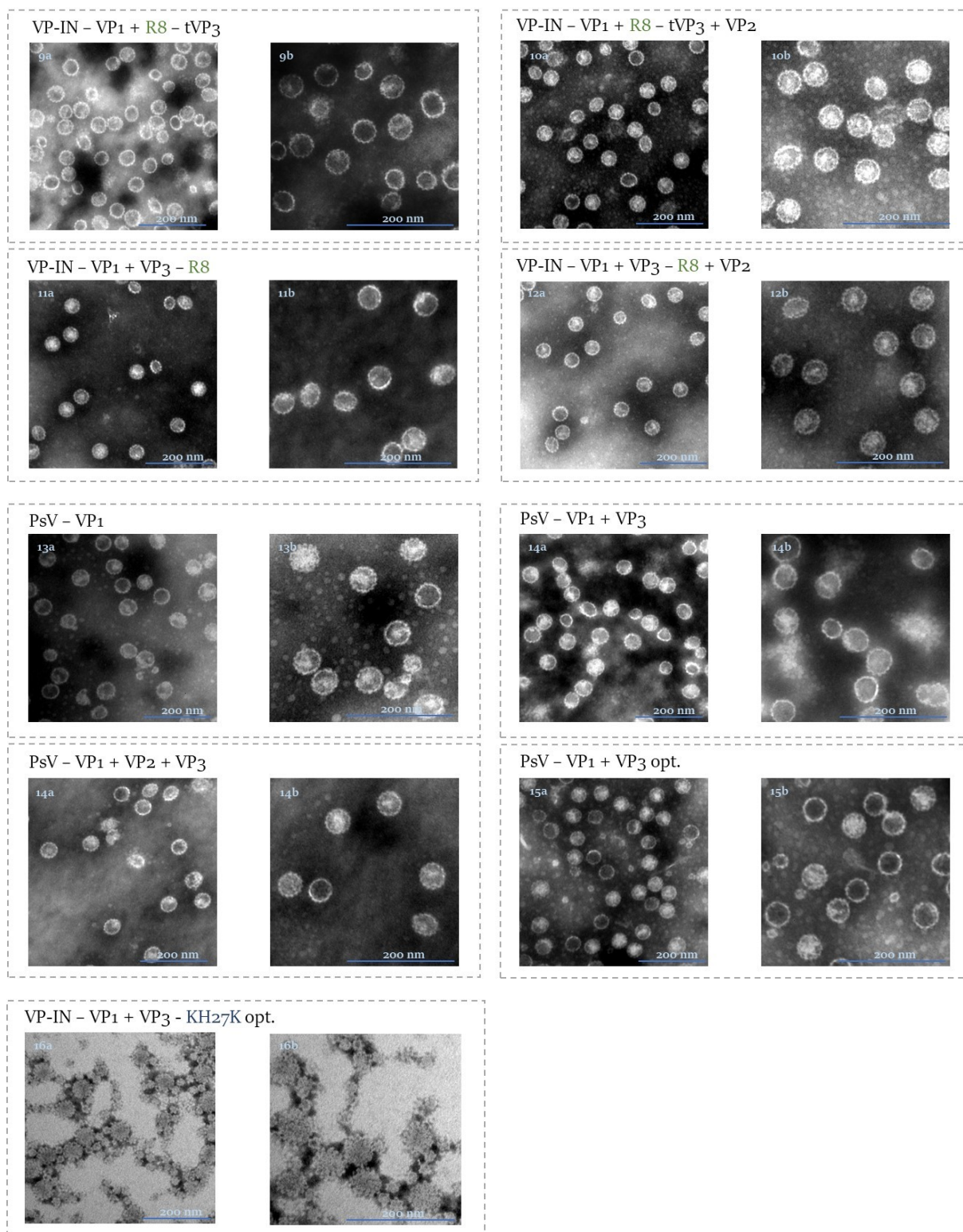
Vzorek	proteinová koncentrace	Objem	Výtěžek
VP-in - VP1 + KH27K - tVP3	57,2 µg/ml	4,4 ml	251,68 µg
VP-in - VP1 + KH27K - tVP3 + VP2	34,6 µg/ml	6,6 ml	228,36 µg
VP-in - VP1 + VP3 - KH27K	115,7 µg/ml	4 ml	462,8 µg
VP-in - VP1 + VP3 - KH27K + VP2	62,56 µg/ml	5,2 ml	326,3 µg
VP-in - VP1 + VP3 - KH27K opt.	384 µg/ml	2,3 ml	883,2 µg
VP-in - VP1 + LAH4 - tVP3	38,7 µg/ml	5,9 ml	228,33 µg
VP-in - VP1 + LAH4 - tVP3 + VP2	32,7 µg/ml	4,2 ml	137,34 µg
VP-in - VP1 + VP3 - LAH4	32,7 µg/ml	6 ml	196,2 µg
VP-in - VP1 + VP3 - LAH4 + VP2	58,4 µg/ml	5 ml	292 µg
VP-in - VP1 + R8 - tVP3	64,15 µg/ml	3,1 ml	198,87 µg
VP-in - VP1 + R8 - tVP3 + VP2	81,4 µg/ml	7 ml	569,8 µg
VP-in - VP1 + VP3 - R8	46,6 µg/ml	3,5 ml	163,1 µg
VP-in - VP1 + VP3 - R8 + VP2	55,4 µg/ml	3,5 ml	193,9 µg
PsV - VP1	51,7 µg/ml	4,5 ml	232,65 µg
PsV - VP1 - VP2 - VP3	39,65 µg/ml	4,6 ml	182,39 µg
PsV - VP1 - VP3	44,8 µg/ml	7,2 ml	322,56 µg
PsV - VP1 - VP3 opt.	382 µg/ml	2 ml	764 µg

Tabulka 10: Tabulka naměřených proteinových koncentrací jednotlivých VP-in, VP-in opt., PsV a PsV opt. Koncentrace proteinů byla měřena pomocí fluorometru Qubit (Invitrogen). Zaznamenané hodnoty jsou průměrem 3 nezávislých měření.

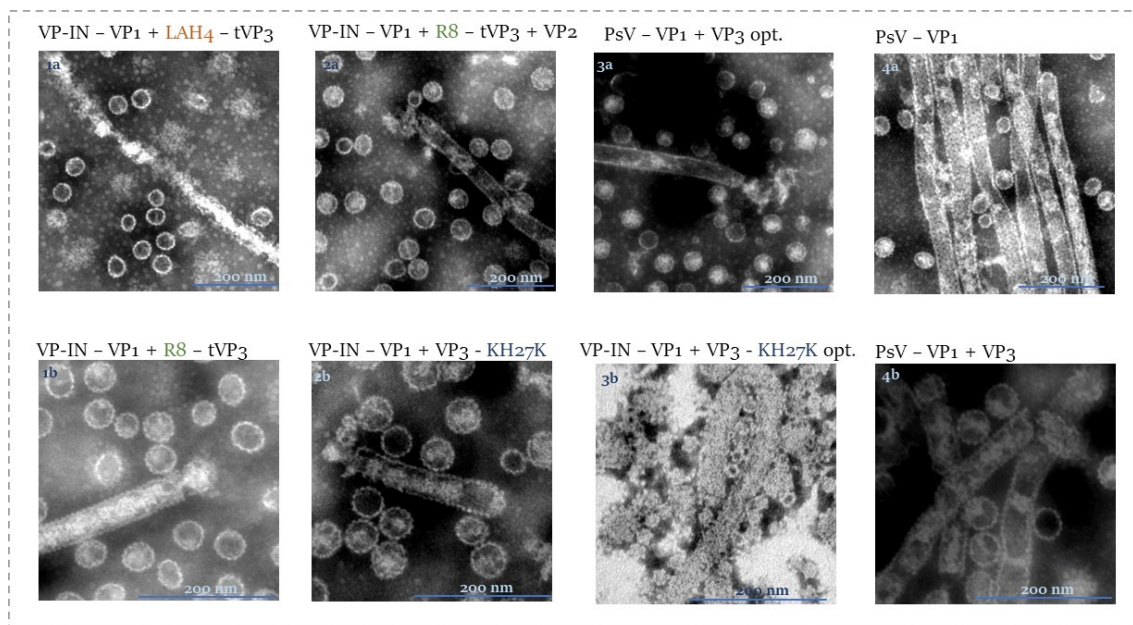
5.5.2 Vizualizace částic pomocí transmisní elektronové mikroskopie

Tvar, velikost a kompaktnost jednotlivých VP-in a PsV byla ověřována elektronovou mikroskopií (viz kapitola 4.2.5.7). Ve vzorcích bylo, dle očekávání, možné pozorovat částice o velikosti přibližně 50 nm odpovídající velikosti polyomavirového virionu a to jak částice prázdné (na snímcích s tmavým vnitřkem), tak i plné se zabalenou DNA (na snímcích s bílým vnitřkem), jak je vidět na obrázku č. 20. Kromě typických struktur byly detekovány i menší částice („tiny“) nebo delší útvary ve tvaru trubice (viz obrázek č. 21) obsahující pravděpodobně propojené pentamery proteinu VP1. Zároveň bylo možné pozorovat i množství nesloženého či již rozpadlého materiálu. U všech variant se však podařilo připravit klasické virové částice.





Obrázek 20: Snímky VP-in a PsV pořízené z pozorování vzorků připravených metodou negativního barvení elektronovým mikroskopem. Částice s „bílým vnitřkem“ obsahují zabalenou DNA, částice s „tmavým vnitřkem“ jsou prázdné. Kromě klasických částic s velikostí přibližně 50 nm jsou na snímcích i malé částice, takzvané „tiny“. Vzorky A jsou foceny se zvětšením 75 000x, Vzorky B jsou foceny se zvětšením 120 000x. V pravém dolním rohu je znázorněna úsečka reprezentující velikost 200 nm.



Obrázek 21: Snímky VP-in a PsV pořízené z pozorování vzorků připravených metodou negativního barvení elektronovým mikroskopem. Snímky vzorků u nichž byly pozorovány tubulární útvary. Vzorky A jsou foceny se zvětšením 75 000x, Vzorky B jsou foceny se zvětšením 120 000x. V pravém dolním rohu je znázorněna úsečka reprezentující velikost 200 nm.

V průběhu přípravy a ověřování všech typů částic bylo bohužel zjištěno, že nelze detekovat expresi proteinu VP2 z plasmidu pH2-VP1, proto částice s VP2 proteinem nebyly do následujících experimentů zařazeny.

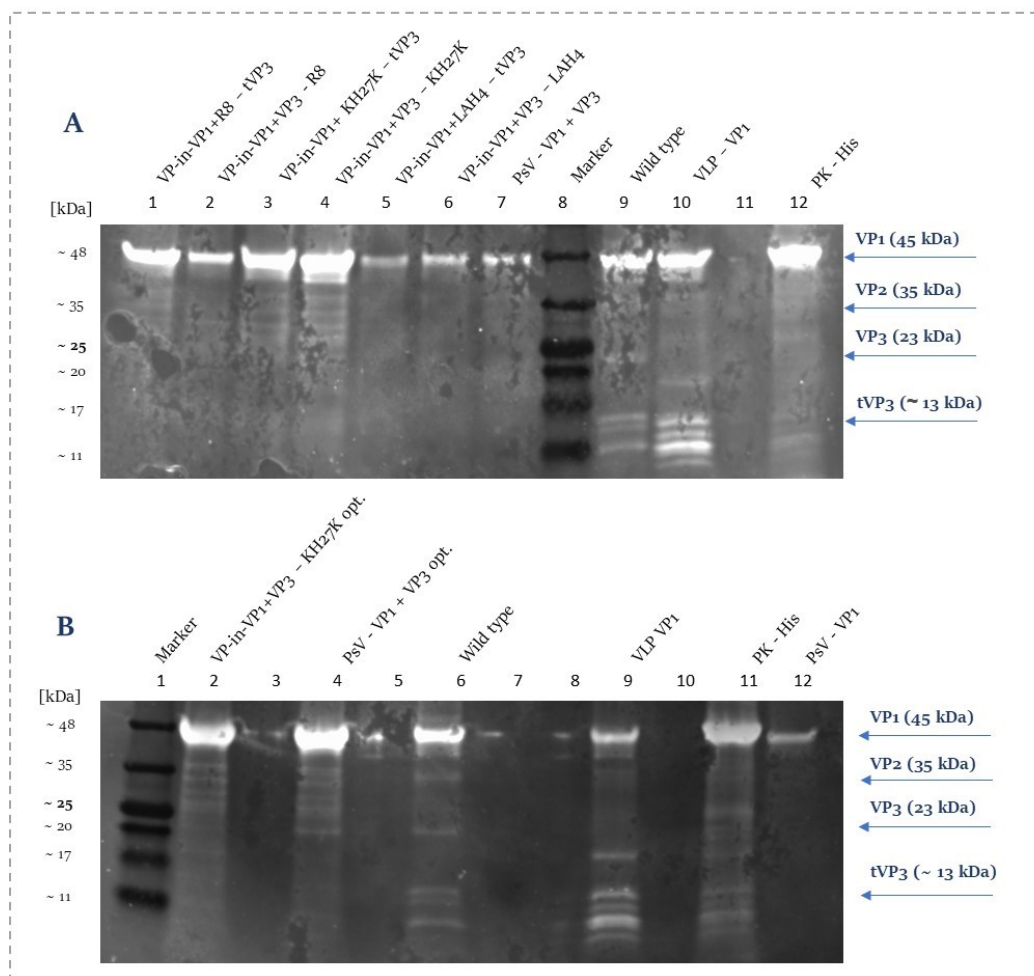
5.5.3 Analýza izolovaných částic pomocí SDS-PAGE v gradientovém gelu a detekce proteinů

Pro ověření, zda vyizolované částice obsahují modifikované varianty proteinu VP3, byla provedena proteinová denaturační elektroforéza v gradientovém 4-20% polyakrylamidovém gelu (4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 12-well, 20 µl, Bio-Rad) (viz kapitola 4.2.5.1). Před nanášením jednotlivých částic na gel bylo nutné vzorky přesrážet methanolem (viz kapitola 4.2.5.8) kvůli jejich nízké proteinové koncentraci. Celkově bylo ze všech vzorků přesráženo 13 µg proteinů, které byly nanášeny na dva identické gely – na první gel bylo nanášeno 11 µg a ten byl poté vyvoláván protilátkami proti VP2/3 proteinům a histidinu, na druhý gel byly nanášeny pouze 2 µg vzorku, ten poté sloužil pro vyvolávání proti proteinu VP1.

5.5.3.1 Imunologická detekce proteinů na membráně

Po elektroforéze byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (viz kapitola 4.2.5.2), jež byla posléze obarvena komerčním vyvolávacím roztokem SYPRO® Ruby Protein Stain (Invitrogen) (viz kapitola 4.2.5.3), který byl použit pro detekci veškerých proteinů přenesených na membránu. Tyto snímky potvrdily, že všechny nanesené částice obsahují protein o velikosti proteinu VP1. Detekci minoritních proteinů zhoršila nižší kvalita snímku, zejména potom pravděpodobně vysrážený materiál viditelný na povrchu nabarvené membrány jak lze vidět na obrázku č. 22. Jako pozitivní kontrola pro virové proteiny VP1, VP2, VP3 sloužil divoký typ viru MPyV. Jako pozitivní kontrola pro detekci polyhistidinu sloužily VLP-VP1 s C-koncem proteinu VP1 modifikovaným 6xHis-Tag připravené Mgr. Dominikem Musilem.

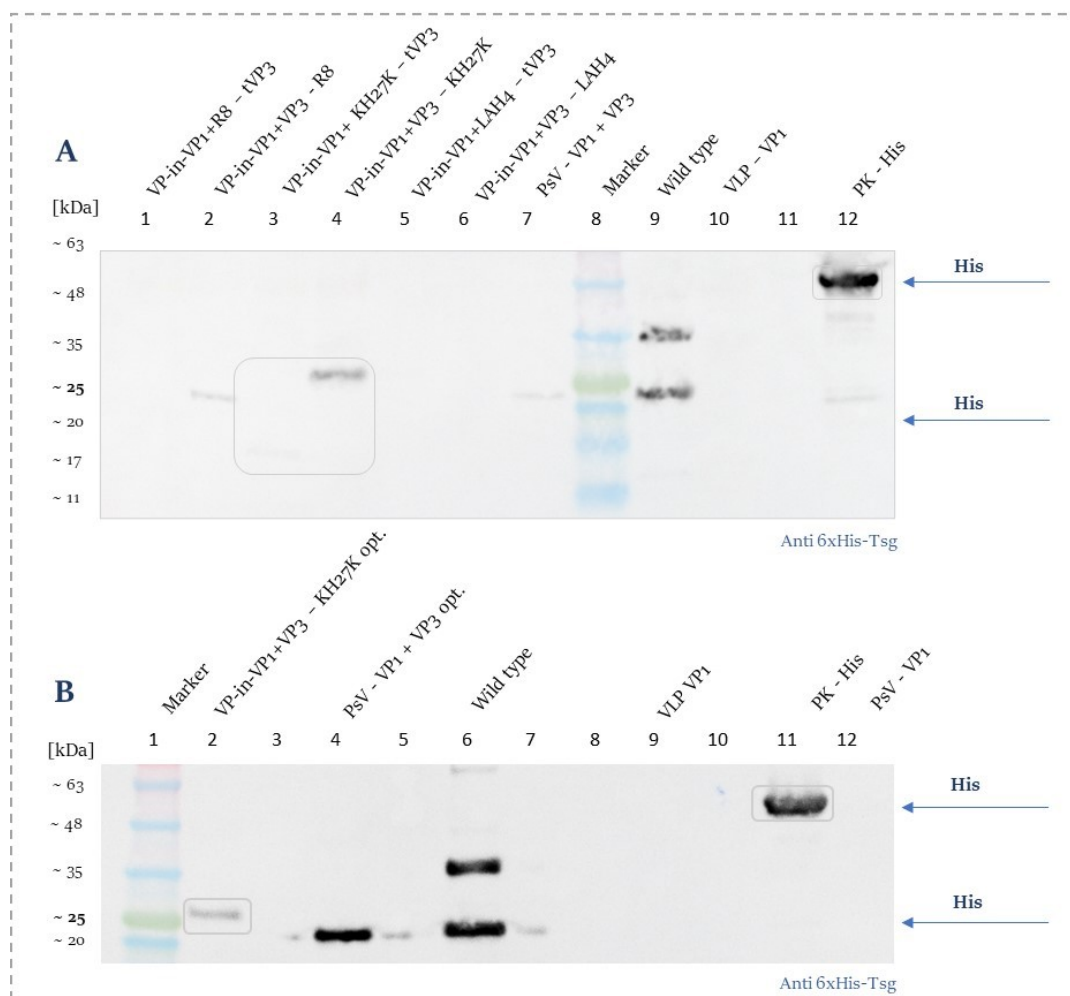
Následně byla membrána blokována a poté imunobarvena (viz kapitola 4.2.5.4). První membrána (s 11 µg vzorku) byla vyvolávána protilátkou proti společné části proteinu VP2 a VP3. Výsledek je na obrázku č. 23. Tato membrána byla použita opakovaně, po inaktivaci křenové peroxidázy inkubací v roztoku peroxidu vodíku, byla vyvolána protilátkou (anti His-tag) proti 6xHis-tagu (viz obrázek č. 24). Druhá membrána (s 2 µg vzorku) byla vyvolávána pouze protilátkou proti proteinu VP1 (viz. Obrázek č. 25).



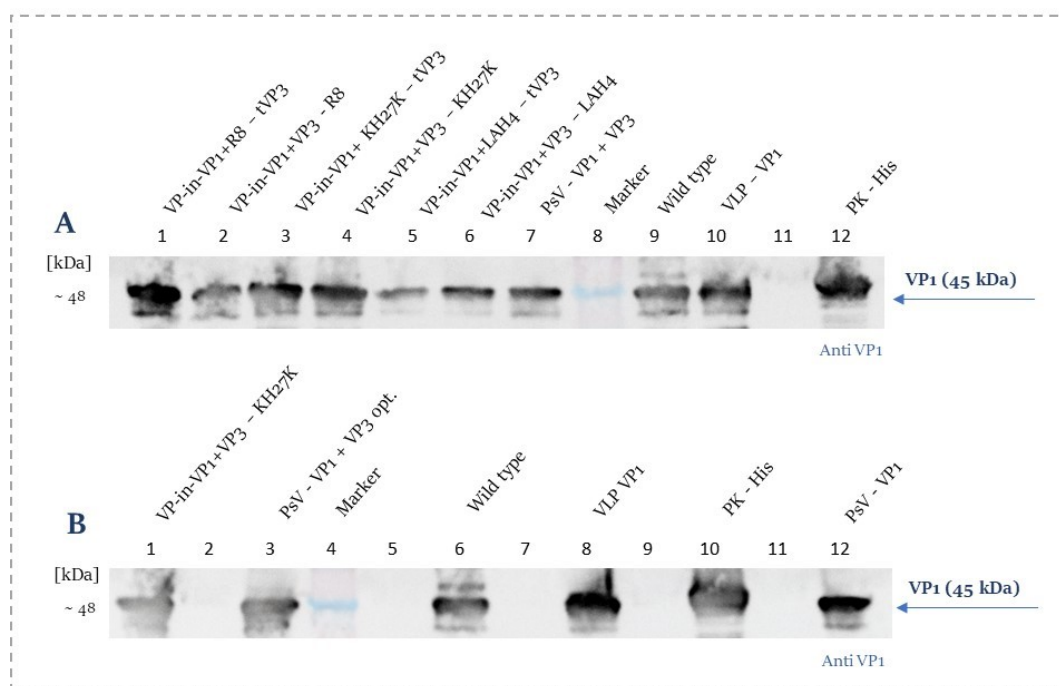
Obrázek 22 Snímky membrán vyvolaných komerčním roztokem SYPRO® Ruby Protein Stain (Invitrogen) na přítomnost veškerých proteinů. Měřítka zobrazuje molekulární hmotnost proteinů v kilodaltonech (kDa) dle markeru (M) Black Protein Ladder (central european BIOSYSTEMS). Jako kontrolní vzorek byl nanesen virus MPyV (wild type) a histidinovou sekvenci obsahující VLP-VP1+HisTag (PK - His).



Obrázek 23 Snímky membrán po imunologickém vyvolání protilátkou proti VP2/3
Měřítka zobrazuje molekulární hmotnost proteinů v kilodaltonech (kDa) dle markeru (M) Black Protein Ladder (central european BIOSYSTEMS). Jako kontrolní vzorek byl nanesen virus MPyV (wild type) a VLP-VP1+HisTag



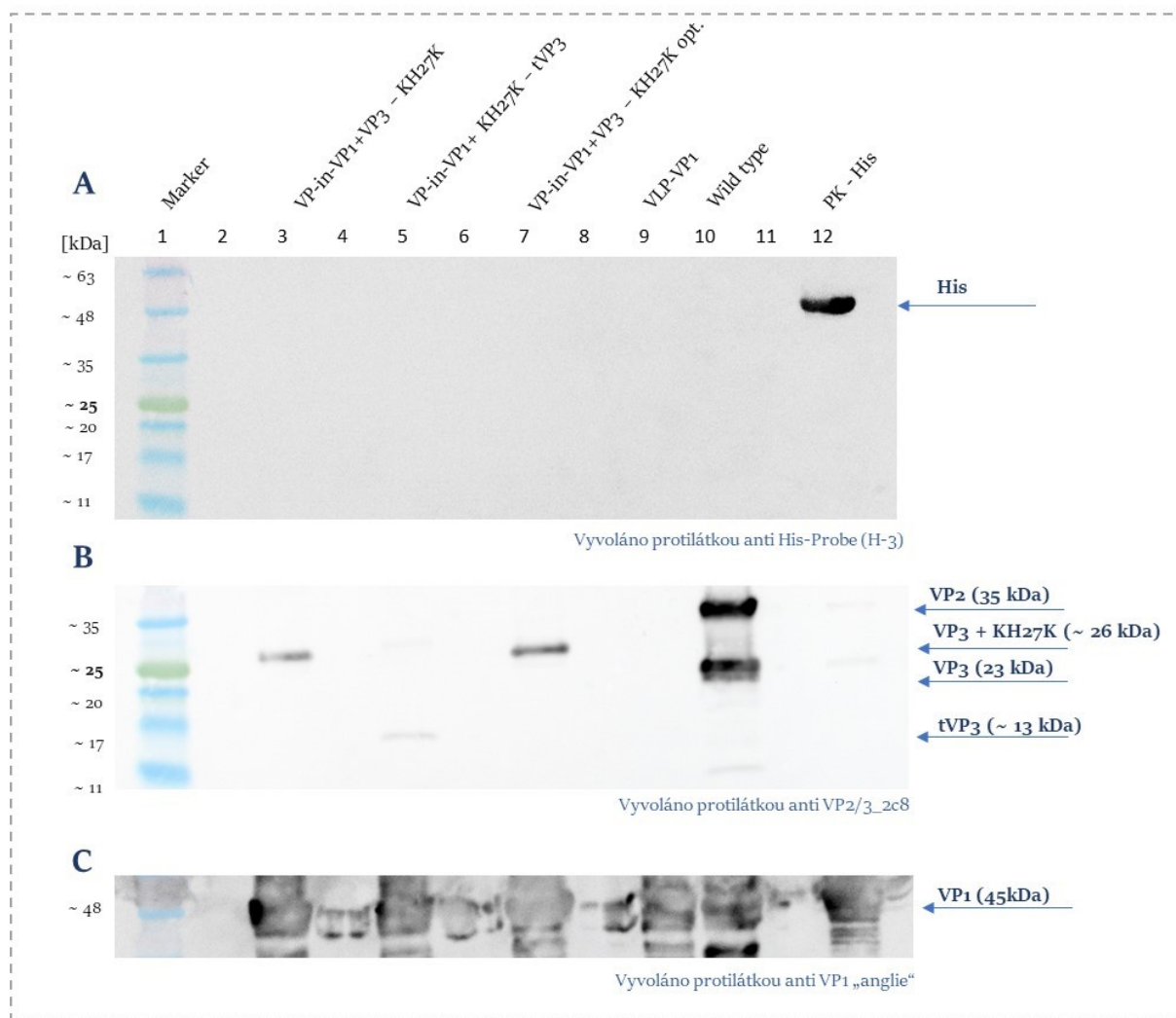
Obrázek 24 Snímky membrán po imunologickém vyvolání protilátkou proti 6xHis-Tag. Měřítka zobrazuje molekulární hmotnost proteinů v kilodaltech (kDa) dle markeru (M) Black Protein Ladder (central european BIOSYSTEMS). Oblast vzorků s očekávaným signálem (VP-in-VP1+KH27K-tVP3, VP-in-VP1+tVP3-KH27K, VP-in-VP1+tVP3-KH27K opt. a PK-His) je na membráně vyznačena obrysem obdélníku. Jako kontrolní vzorek byl nanesen virus MPyV (wild type) a VLP-VP1+HisTag (PK - His)



Obrázek 25 Snímky membrán po imunologickém vyvolání protilátkou proti VP1. Měřítka zobrazuje molekulární hmotnost proteinů v kilodaltech (kDa) dle markeru (M) Black Protein Ladder (central european BIOSYSTEMS). Jako kontrolní vzorek byl nanesen virus MPyV (wild type) a VLP-VP1+HisTag (PK - His).

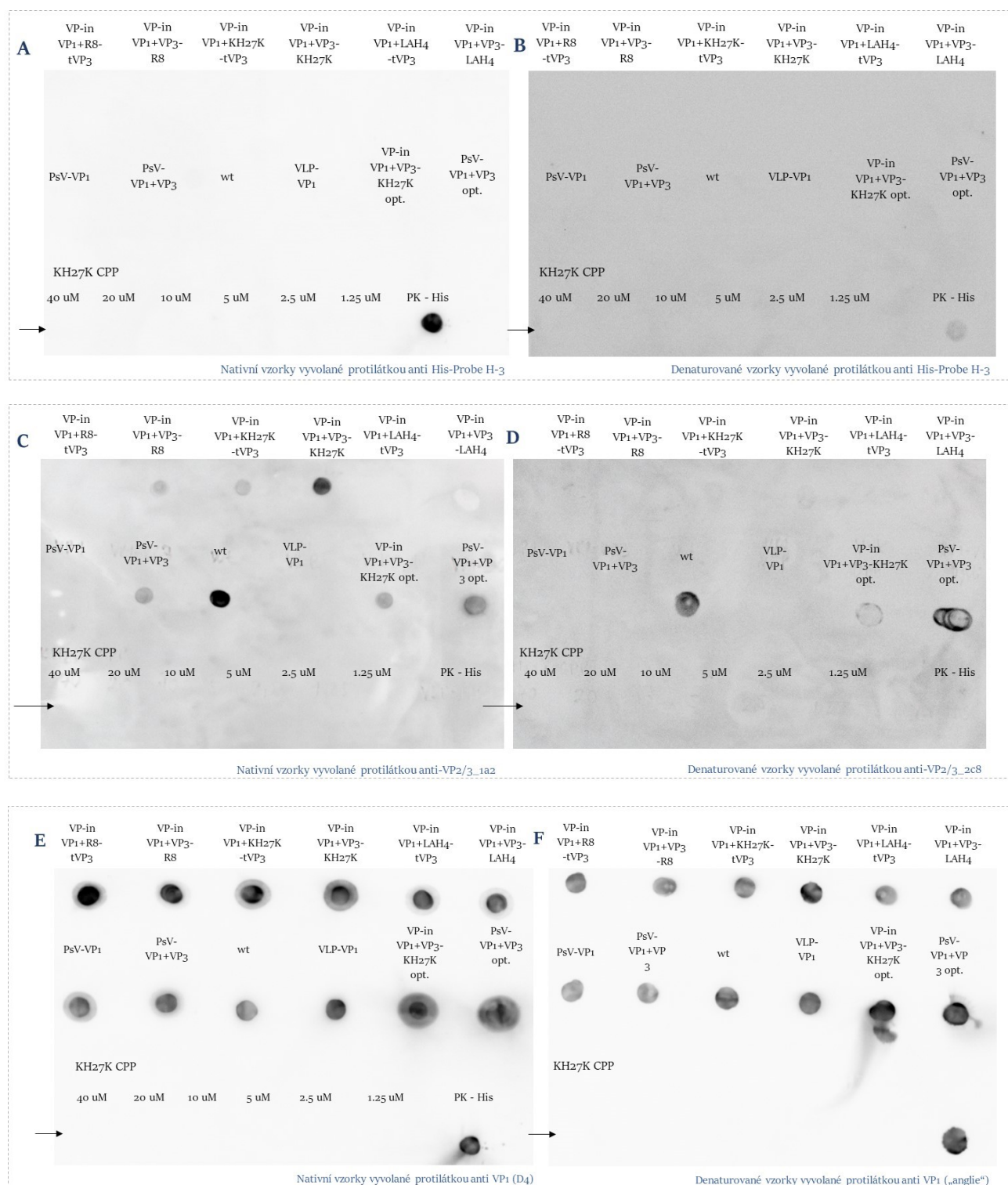
Imunobarvení potvrdilo, že všechny nanesené vzorky obsahovaly protein VP1 (viz obrázek č. 25), nicméně je ze snímků patrné, že nebyly i přes veškerou snahu nanášeny ve stejném množství. VP3 protein nebo jeho část se podařilo detekovat u všech kontrolních částic, stejně tak u modifikovaných částic pouze s výjimkou LAH4 částic (viz obrázek č. 23). Tyto VP-in-LAH4 částice jsou právě ty, které mají podstatně nižší signál i u proteinu VP1, je tedy pravděpodobné, že se s minoritními proteiny nacházím pod detekčním limitem metody.

Jak je ze snímků membrán opětovně vyvolaných protilátkou proti 6xHis-Tag patrné (viz obrázek č. 24), bohužel se nepodařilo u vzorků VP-in-VP1+KH27K-tVP3, VP-in-VP1+tVP3-KH27K a VP-in-VP1+tVP3-KH27K opt. přítomnost polyhistidinu prokázat, pravděpodobně proto, že již navázaná anti-VP2/3 protilátka mohla stéricky bránit jejímu nasednutí, a navíc se v případě obou protilátek jednalo o protilátku myší, takže nedošlo k jednoznačnému odlišení signálů. Proto byly částice znovu přesráženy methanolem a znovu nanesený na gel. V tomto případě bylo vstupní množství navýšeno na 16 μ g a používaná protilátka byla Anti-His Probe H-3 (Santa Cruz Biotechnology). Membrána byla po inaktivaci křenové peroxidázy inkubací v roztoku peroxidu vodíku znovu vyvolána i proti VP1 a VP2/3 (viz obrázek č. 26).



Obrázek 26 Snímky membrán po imunologickém vyvolání protilátkou proti 6xHis-Tag (A), VP2/3 (B), VP1 (C) Měřítka zobrazuje molekulární hmotnost proteinů v kilodaltonech (kDa) dle markeru (M) Black Protein Ladder (central european BIOSYSTEMS). Jako kontrolní vzorek byl nanesen divoký typ viru MPyV (wild type) a VLP-VP1+HisTag (PK - His)

Přestože bylo možné detekovat VP3 protein pomocí protilátky proti VP2/3, detekce samotného KH27K navázaného na VP3 se nezdařila. Částice byly tedy znovu ověřeny pomocí nativní i denaturační metody Dot Blot. Pro kontrolu, zda je protilátka anti His-Probe (H-3) schopna se navázat na KH27K byl přidán samotný peptid v různých koncentracích. Pro kontrolu byly pro následnou imunodetekci využity i protilátky proti proteinům VP2/3: pro detekci při denaturační variantě metody Dot blotu byla použita stejná protilátka (anti-VP2/3_2c8) jako pro detekci pomocí metody western blot, pro detekci při nativní variantě metody Dot blot byla využita protilátka proti nativním proteinům VP2 a VP3 (anti-VP2/3_1A2), a také byla přítomnost virového materiálu ověřena detekcí proteinu VP1 protilátkou proti nativním částicím – anti vP1 (D4) a protilátkou proti denaturovaným částicím anti VP1 „anglie“. Membrány vyvolané všemi zmíněnými protilátkami jsou na obrázku č. 27.



Obrázek 27: Snímky membrán po imunologickém vyvolání protilátkou proti 6xHis-Tag (A, B), VP2/3 (C, D), VP1 (E, F). Na membránu A byly naneseny částice v nativním stavu, na membránu B byly naneseny částice denaturované. Jako kontrolní vzorek byl nanesen divoký typ viru MPyV (wt) a VLP-VP1+6xHis-Tag (PK - His)

Protilátka anti-VP2/3_1A2 detekuje VP3 lépe než protilátka proti denaturovanému proteinu. Pomocí nativního Dot Blotu je možné vidět signál u VP-in s KH27K ve všech variantách, u VP1+VP3-R8, u

pseudovirionů VP1+VP3 a VP1+VP3 opt. i u wildtype MPyV. Naopak u denaturovaných částic je signál viditelný pouze u wt MPyV, PsV-VP1+VP3 opt., VP-in-VP1+VP3-KH27K opt. a velmi slabě u zbylých variant VP-in s KH27K. Zatímco VP-in s LAH4 a VP1+R8-tVP3 se bohužel nepodařilo detekovat.

Z membrán vyvolaných protilátkou His-Probe H-3 je zřejmé, že protilátka vůbec nerozeznává peptid KH27K.

5.5.4 Kvantifikace zabalené plasmidové DNA uvnitř částic

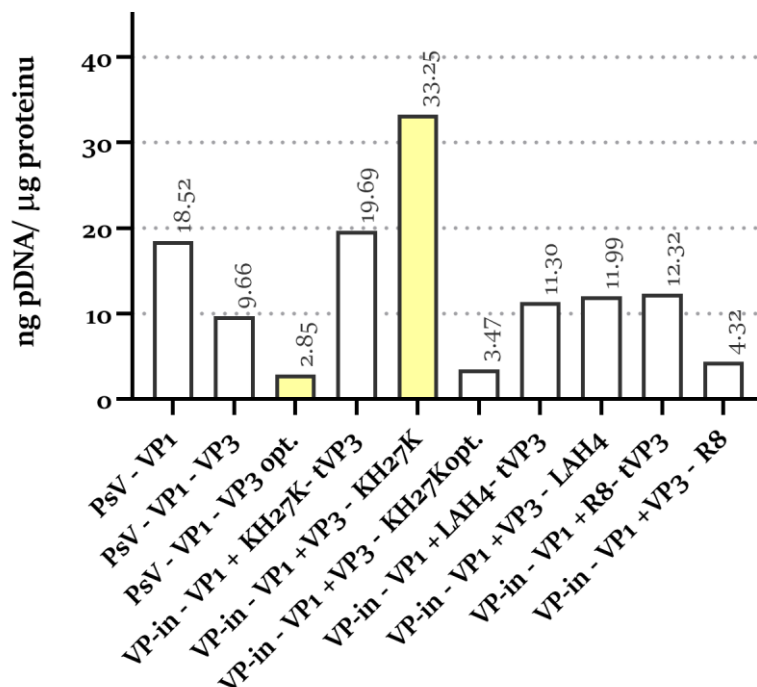
Další z metod, kterou byly částice charakterizovány, byla qPCR, díky níž bylo stanoveno množství zabalené DNA reportérového plasmidu (pGL3-control) v částicích (viz kapitola 4.2.7.1.2). Aby nedošlo ke kontaminaci DNA zachycenou na povrchu izolovaných částic, byly vzorky ošetřeny DNázou I a po její inaktivaci byla enkapsidovaná DNA izolována pomocí soupravy GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit (Thermo Scientific) (viz kapitola 4.2.7.1.1). Izolovaná DNA byla kvantifikována pomocí qPCR. Pro nastavení optimálních podmínek byla izolovaná DNA analyzována v ředění 5x, 25x a 125x. Vzorky byly měřeny v rámci jednoho experimentu v tetraplikátech. Vyhodnocení probíhalo pomocí softwaru LightCycler® 480 SW 1.5.1 (Roche), koncentrace pDNA byla stanovena pomocí modulu „Absolute quantification“ s využitím algoritmu pro vyhodnocení maxima 2. derivace. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce č. 11 a grafu č. 1.

Vzorek	ng DNA/ μ l vzorku	μ g protein/ml vzorku	ng DNA/ μ g proteinu
VP-in - VP1 + KH27K - tVP3	1.12	57	19.69
VP-in - VP1 + VP3 - KH27K	3.86	116	33.25
VP-in - VP1 + VP3 - KH27K opt.	1.33	384	3.47
VP-in - VP1 + LAH4 - tVP3	0.44	39	11.30
VP-in - VP1 + VP3 - LAH4	0.40	33	11.99
VP-in - VP1 + R8 - tVP3	0.79	64	12.32
VP-in - VP1 + VP3 - R8	0.20	47	4.32
PsV - VP1	0.96	52	18.52
PsV - VP1 - VP3	0.43	45	9.66
PsV - VP1 - VP3 opt.	1.09	382	2.85

Tabulka 11: Průměrná koncentrace pDNA ve vzorcích VP-in a PsV.

Pro přehlednost jsou vzorky s nejvyšší a nejnižší naměřenou koncentrací pDNA zvýrazněny žlutě.

Obsah pDNA ve virových částicích



Graf 1: Průměrná koncentrace pDNA ve vzorcích VP-in a PsV. Hodnoty vychází z tabulky č. 11. Pro přehlednost jsou vzorky s nejvyšší a nejnižší naměřenou koncentrací pDNA zvýrazněny žlutě. Vzorky jsou v grafu vyneseny v jednotkách ng pDNA/ µg proteinu

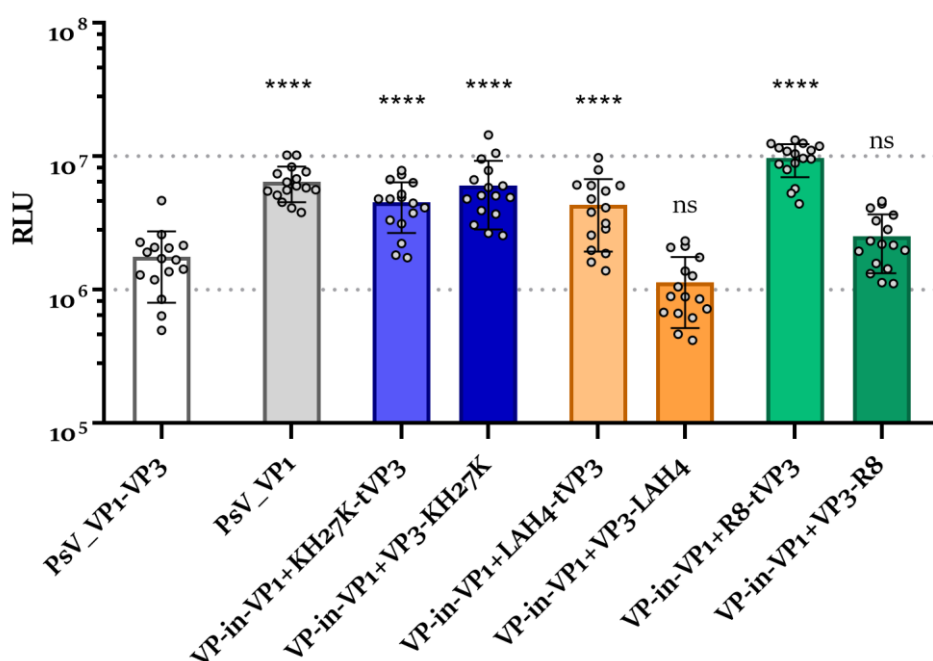
Z tabulky č. 11 a grafu č. 1 je patrné, že nejvíce pDNA bylo obsaženo v částicích VP-in+VP3-KH27K a nejméně naopak v pseudovirionech VP1-VP3 opt. Největší rozdíly jsou viditelné mezi vzorky VP-in-VP1+VP3-KH27K opt., VP-in-VP1+VP3-R8, PsV-PV1-VP3 opt. a VP-in-VP1+VP3-KH27K.

5.6 Luciferázový test

Pro srovnání účinnosti transdukce, tedy efektivity přenosu pDNA do buněk, jednotlivých modifikovaných VP-in a nemodifikovaných pseudovirionů, byl použit luciferázový test založený na měření luciferázového signálu. Pro vyhodnocování transdukční účinnosti je využívána buněčná linie 293TT, která zajišťuje vysokou citlivost měření díky faktu, že po úspěšné dopravě pDNA do jádra může docházet k amplifikaci pDNA (obsahuje sekvenci SV40 ori) a zvýšené expresi luciferázy. Do každé jamky 96-jamkové destičky vyseto 40 000 buněk, a po 3 hodinové inkubaci byly k buňkám přidány jednotlivé vzorky o shodném množství pDNA: 10 ng na každou jamku (viz kapitola 4.2.7.2). Celkem byly provedeny čtyři nezávislé

experimenty s jednotlivými vzorky v tetraplikátech. Nejdříve byla porovnávána efektivita transdukce modifikovaných virpotérů-in vůči kontrolním pseudovirionům PsV_VP1-VP3 (viz graf č. 2), poté byla porovnávána efektivita přenosu pomocí pseudovirionů ko-inkubovaných s CPP vůči PsV_VP1-VP3 (viz graf č. 3), a nakonec byl také vyhodnocen rozdíl efektivit transdukce mezi stejně připravenými vzorky, ale odlišně izolovanými, tedy PsV_VP1-VP3 (izolováno pomocí ultracentrifugace v gradientu CsCl) a PsV_VP1-VP3 opt. (izolováno pomocí ultracentrifugace v gradientu jodixanolu) (viz graf č. 4)

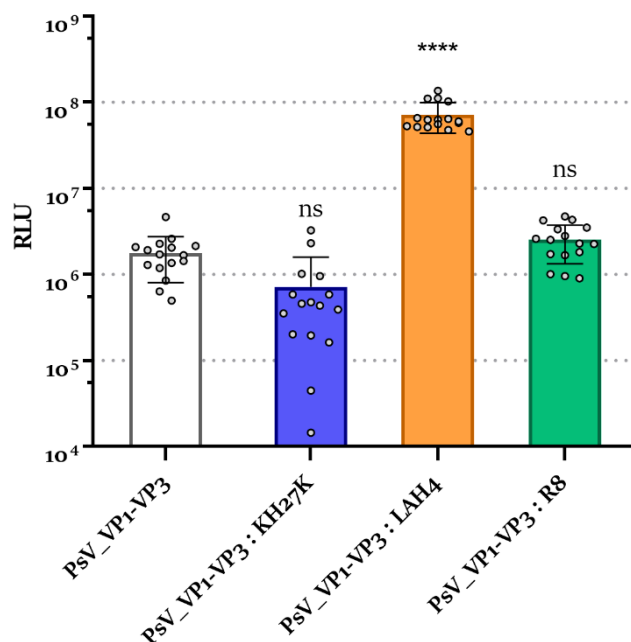
Srovnání účinnosti transdukce virportéru-in s PsV



Graf 2: Graf srovnání účinnosti transdukce jednotlivých VP-in vůči PsV-VP1-VP3. Osa y znázorňuje hodnotu bioluminiscence v jednotkách RLU (Relativní luciferázová jednotka). Normalita dat byla analyzována pomocí testu ANOVA a následně rozdíly mezi jednotlivými typy částic byly testovány Dunnettovým testem mnohonásobných porovnání. P hodnota byla adjustována dle Dunnettova kritéria pro mnohonásobné porovnání. Hvězdička vyjadřuje statistickou významnost (****p < 0.0001)

Post hoc analýzou mnohonásobného porovnání bylo poukázáno na statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolními částicemi (PsV-VP1-VP3) a všemi variantami vzorků kromě VP-in-VP1+VP3-R8 a VP-in-VP1+VP3-LAH4. Tímto testem bylo zjištěno, že nejefektivněji DNA do jádra dopravují virportéry-in VP-in-VP1+R8-tVP3 a to více než 5x účinněji než kontrolní PsV. Proti kontrolním částicím jsou naopak méně účinné částice VP-in-VP1+VP3-LAH4, které přenos do jádra snižovaly.

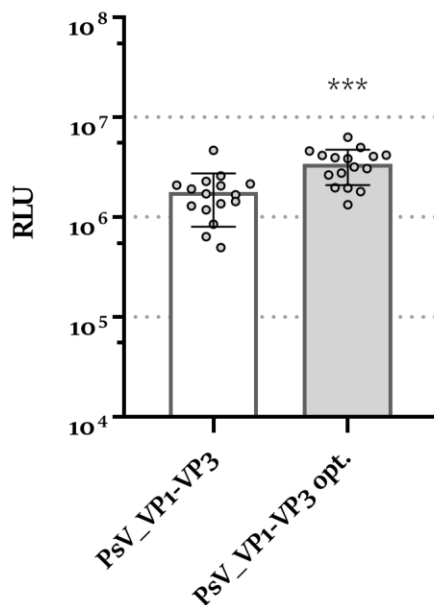
Srovnání účinnosti transdukce PsV koinkubovaných s CPP s kontrolními PsV



Graf 3: **Graf srovnání účinnosti transdukce PsV-VP1-VP3 ko-inkubovaných s CPP vůči PsV-VP1-VP3.** Osa y znázorňuje hodnotu bioluminiscence v jednotkách RLU (Relativní luciferázová jednotka). Vzorky pouze ko-inkubované s CPP jsou označeny „:“ mezi částicí a CPP. Koinkubace probíhala vždy 30 minut a poté byly částice (s CPP) přidány k buňkám Normalita dat byla analyzována pomocí Kruskal-Wallisova testu a následně rozdíly mezi jednotlivými typy částic byly testovány Dunnettovým testem mnohonásobných porovnání. P hodnota byla adjustována dle Dunnetova kritéria pro mnohonásobné porovnání. Hvězdička vyjadřuje statistickou významnost (****p < 0.0001).

Post hoc analýzou mnohonásobného porovnání bylo poukázáno na statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolními částicemi (PsV-VP1-VP3) a PsV-VP1-VP3 ko-inkubovanými s LAH₄, nikoliv však PsV-VP1-VP3:KH27K a PsV-VP1-VP3:R8. Experiment ukázal, že ko-inkubace s LAH₄ zvyšuje transdukci do jádra více než 40- násobně.

Srovnání účinnosti transdukce PsV_VP1 - VP3 CsCl a PsV_VP1 - VP3 opt



Graf 4 **Graf srovnání účinnosti transdukce PsV_VP1-VP3 izolovaných pomocí dvoustupňového gradientu CsCl vůči PsV_VP1-VP3 izolovaných metodou Optiprep.** Osa y znázorňuje hodnotu bioluminiscence v jednotkách RLU (Relativní luciferázová jednotka). Data byla analyzována pomocí nepárového T-testu. Hvězdička vyjadřuje statistickou významnost (***) $p < 0.0003$.

Pomocí nepárového T-testu bylo poukázáno na statisticky signifikantní rozdíl mezi částicemi PsV-VP1-VP3 a PsV-VP1-VP3 opt. Ačkoliv se jedná o stejné vzorky pouze izolované jiným způsobem, test transdukční efektivity ukázal, že PsV-VP1-VP3 opt. jsou schopny přenést pDNA do jádra 2x efektivněji než PsV-VP1-VP3.

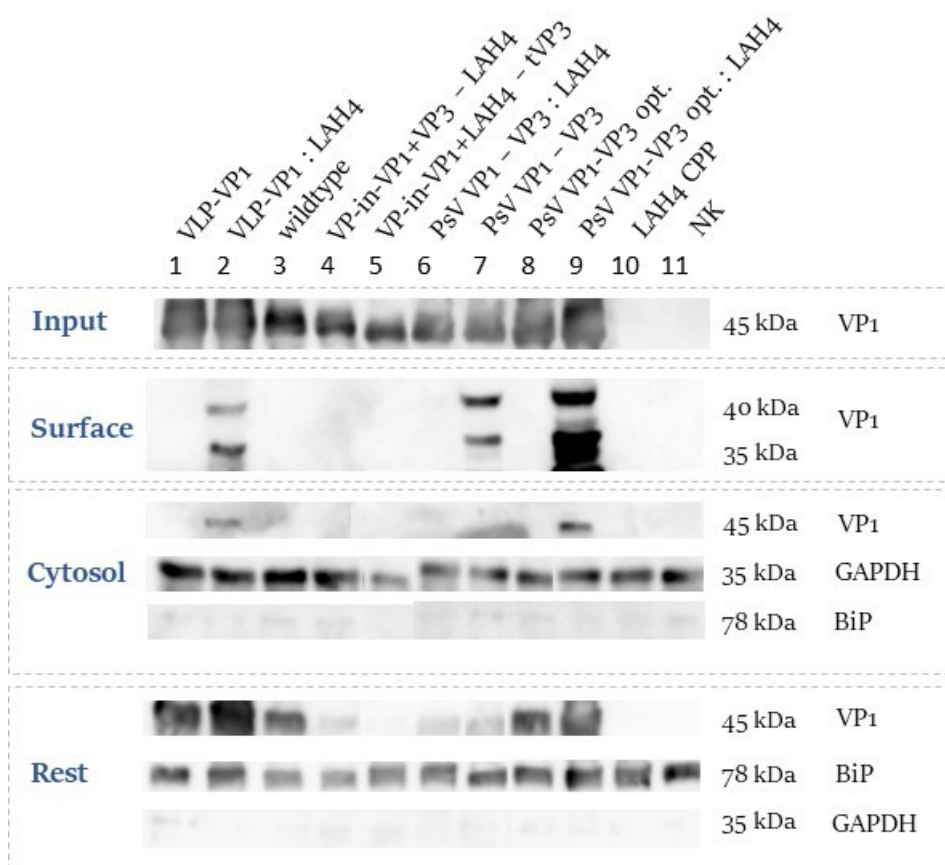
5.7 Mapování intracelulární lokalizace virových částic pomocí frakcionace

Pro porovnání účinku jednotlivých CPP a pro určení, zda je možné připravené částice nalézt v cytoplazmě, kam pravděpodobně unikly z endosomu, případně ER, byla zvolena metoda biochemické frakcionace buněk. Nejprve byly experimenty prováděny s využitím přístupu publikovaného v (Inoue & Tsai, 2011), který je založen na pouhé separaci cytoplasmatické frakce pomocí jemné permeabilizace plasmatické membrány digitoninem a následné centrifugaci zajišťující peletování všech ostatních buněčných kompartmentů (včetně endosomů a ER). Buňky byly pseudoinfikovány VP-In, PsV nebo VLP

a rozděleny na jednotlivé frakce (viz kapitola 4.2.7.3). Po mnohých optimalizacích metody byl experiment prováděn následovně: bylo přidáno 15 µg částic ředěných v 500 µl bezsérového média na přibližně 6×10^5 293TT buněk. Paralelně byly provedeny koinkubace, při nichž byly kontrolní částice koinkubovány 30 minut s CPP a poté přidávány k buňkám. Zároveň byla vždy prováděna tzv. „mock infekce“, kdy pro pseudoinfekci nebyly použity žádné virové částice, pouze bezsérové médium. Buňky byly po přidání částic inkubovány 1 hodinu, po 1 hodině bylo přidáno médium se sérem a vzorky byly inkubovány 3 hodiny v termostatu při 37°C. Po 4 hodinách bylo odebráno médium (s částicemi, které zůstaly v roztoku), buňky byly buňky ošetřeny trypsinem a inhibitem trypsinu a byl odebrán vzorek, který obsahoval částice, které se ve chvíli ukončení experimentu nacházely na buněčném povrchu, ale do buňky nevstoupily. Tento vzorek je označen jako „Surface“. Poté byla buňka pomocí digitoninu (který selektivně permeabilizuje plazmatickou membránu, zatímco zbylé membrány zůstávají neporušené) a následné centrifugace rozdělena na frakci cytosolickou (označenou jako „Cytosol“) a zbytkovou, obsahující veškeré membrány a zbylou buněčnou debris (označenou jako „Rest“). Vzorky Surface byly přesráženy methanolem (viz kapitola 4.2.5.8). Všechny frakce jednotlivých vzorků, tedy vstupní množství („Input“), Surface, Cytosol a Rest, byly rozděleny pomocí polyakrylamidové SDS elektroforézy (viz kapitola 4.2.5.1). Následně byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu (viz kapitola 4.2.5.2) a analyzovány pomocí imunodetekce protilátkami (viz kapitola 4.2.5.4) proti proteinu VP1, proti GAPDH (marker cytosolické frakce) a pro kontrolu účinnosti separace ER proti BiP (GRP78), jakožto markeru endoplasmatického retikula, které by se mělo při tomto typu hrubé frakcionace nacházet ve frakci zbytkové.

Nejdříve bylo zvoleno **pořadí experimentu, které nám dovolovalo mezi sebou přímo porovnávat jednotlivé částice** (VP-in, PsV, VLP) **se stejným CPP**, tedy částice geneticky modifikované daným CPP, částice kontrolní a částice kontrolní, které byly před přidáním na buňky 30 minut inkubované s CPP (nekovalentní modifikace). Výsledek tohoto typu frakcionace je na obrázcích č. 28, 29 a 30.

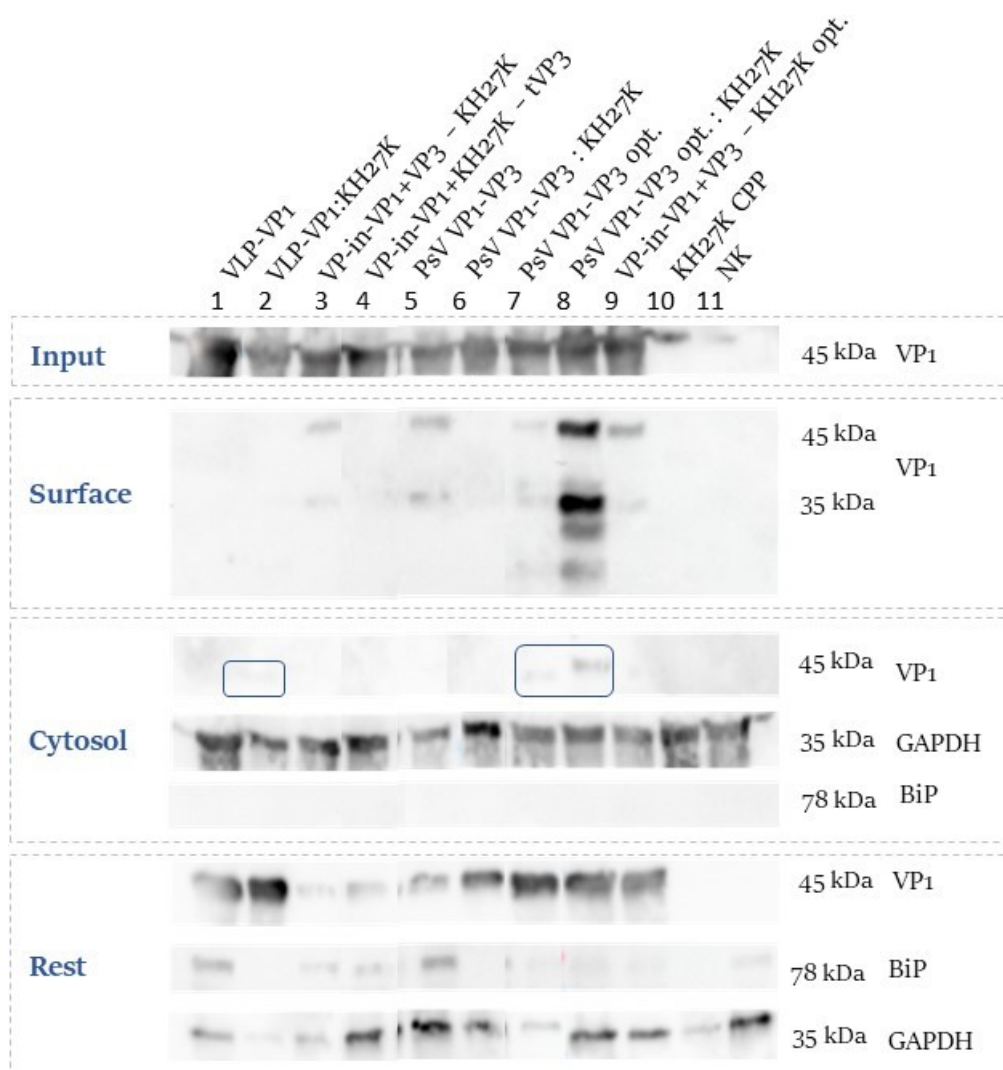
Frakcionace buněk po pseudoinfekci v přítomnosti LAH4



Obrázek 28: Snímky membrán částic po frakcionaci buněk pseudoinfikovaných s účastí peptidu LAH4 po imunologickém vyvolání. Membrány vyvolány protilátkou proti VP1 pro detekci virových částic, GAPDH jako marker frakce Cytosol a BiP jako marker frakce Rest. Vzorky pouze ko-inkubované s LAH4 jsou označeny „:“ mezi částicí a LAH4. U vzorků označených jako NK (negativní kontrola) se jedná o tzv. „mock infekci“.

U frakcionace buněk, při které probíhala pseudoinfekce v přítomnosti LAH4 peptidu byl pozorován účinek peptidu, pokud byl ko-inkubován s VLP (VLP:LAH4), PsV-VP1+VP3 (PsV-VP1+VP3:LAH4), PsV-VP1+VP3_opt. (PsV-VP1+VP3_opt.:LAH4), ve všech případech bylo částic (tj. VP1 proteinu) ve frakci Rest více, než stejných částic bez ko-inkubace. Zároveň byly detekovány i v Cytosolické frakci. Zajímavé ale je, že VLP:LAH4 a PsV-VP1+VP3_opt. byly ve velkém množství nalezeny přichycené na buňce ve chvíli sklizení před frakcionací. To naznačuje, že peptid LAH4 při ko-inkubaci významně zvyšuje celkové množství virových částic interagujících s jejím povrchem.

Frakcionace buněk po pseudoinfekci v přítomnosti KH27K

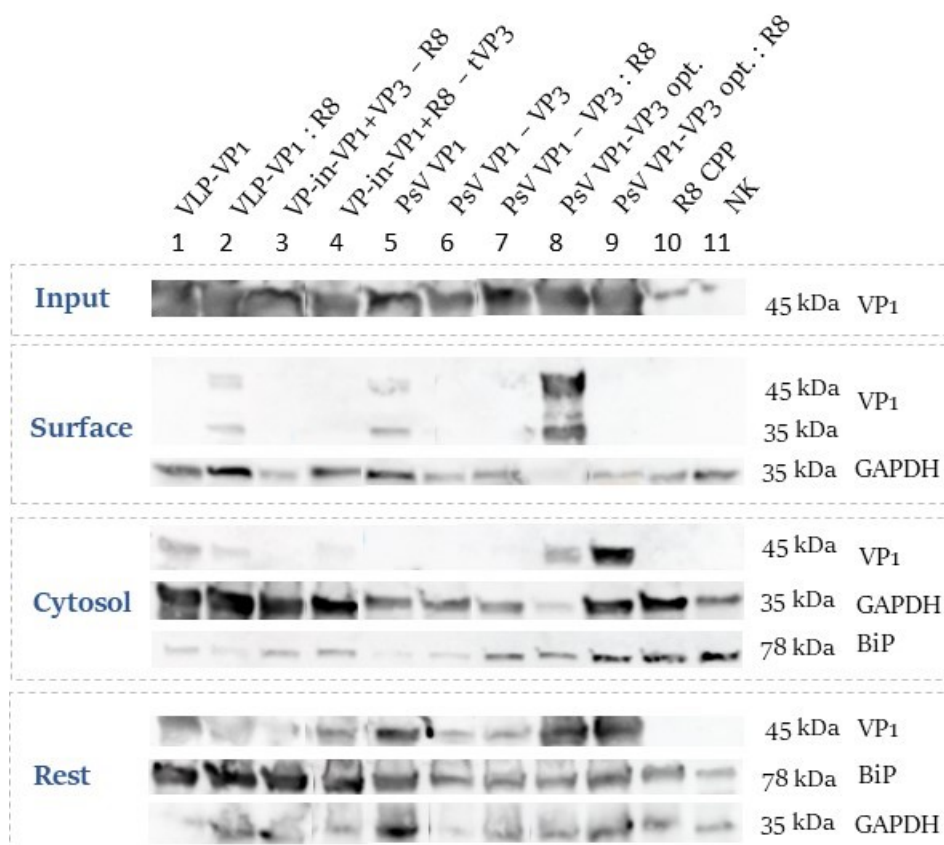


Obrázek 29: Snímky membrán částic po frakcionaci buněk pseudoinfikovaných s účastí peptidu KH27K po imunologickém vyvolání. Membrány vyvolány protilátkou proti VP1 pro detekci virových částic, GAPDH jako marker frakce Cytosol a BiP jako marker frakce Rest. Vzorky pouze ko-inkubované s KH27K jsou označeny „:“ mezi částicí a KH27K. U vzorků označených jako NK (negativní kontrola) se jedná o tzv. „mock infekci“.

Podobný výsledek byl získán i po frakcionaci buněk, kdy pseudoinfekce probíhala s účastí peptidu KH27K. Znovu byl patrný silnější signál VP1 jak ve frakci *Cytosol* tak ve frakci *Rest* v případě částic pouze ko-inkubovaných s CPP proti PsV neinkubovaným. Tentokrát ale byl pozorován silnější signál VP1 u částic přichycených na CPM. Nicméně velikost detekovaného VP1 proteinu je nižší než odpovídá běžně pozorované velikosti (45 kDa), je přibližně 30 kDa nebo nižší, což naznačuje, že částice byly při přípravě vzorku senzitivní k působení trypsinu, možná díky destabilizaci částic KH27K došlo k rozštěpení VP1 proteinu na menší úseky. Z obrázku č. 29 je však bohužel také patrné, že marker ER (BiP) se ve zbytkových frakcích vyskytoval velmi málo a jeho množství se lišilo mezi vzorky a naopak GAPDH jakožto

marker frakce cytosolické je možné detekovat ve frakce *Rest*. Pravděpodobně tedy došlo ke kros kontaminaci jednotlivých frakcí a výsledky tedy nemají dostatečnou vypovídací hodnotu.

Frakcionace buněk po pseudoinfekci v přítomnosti R8

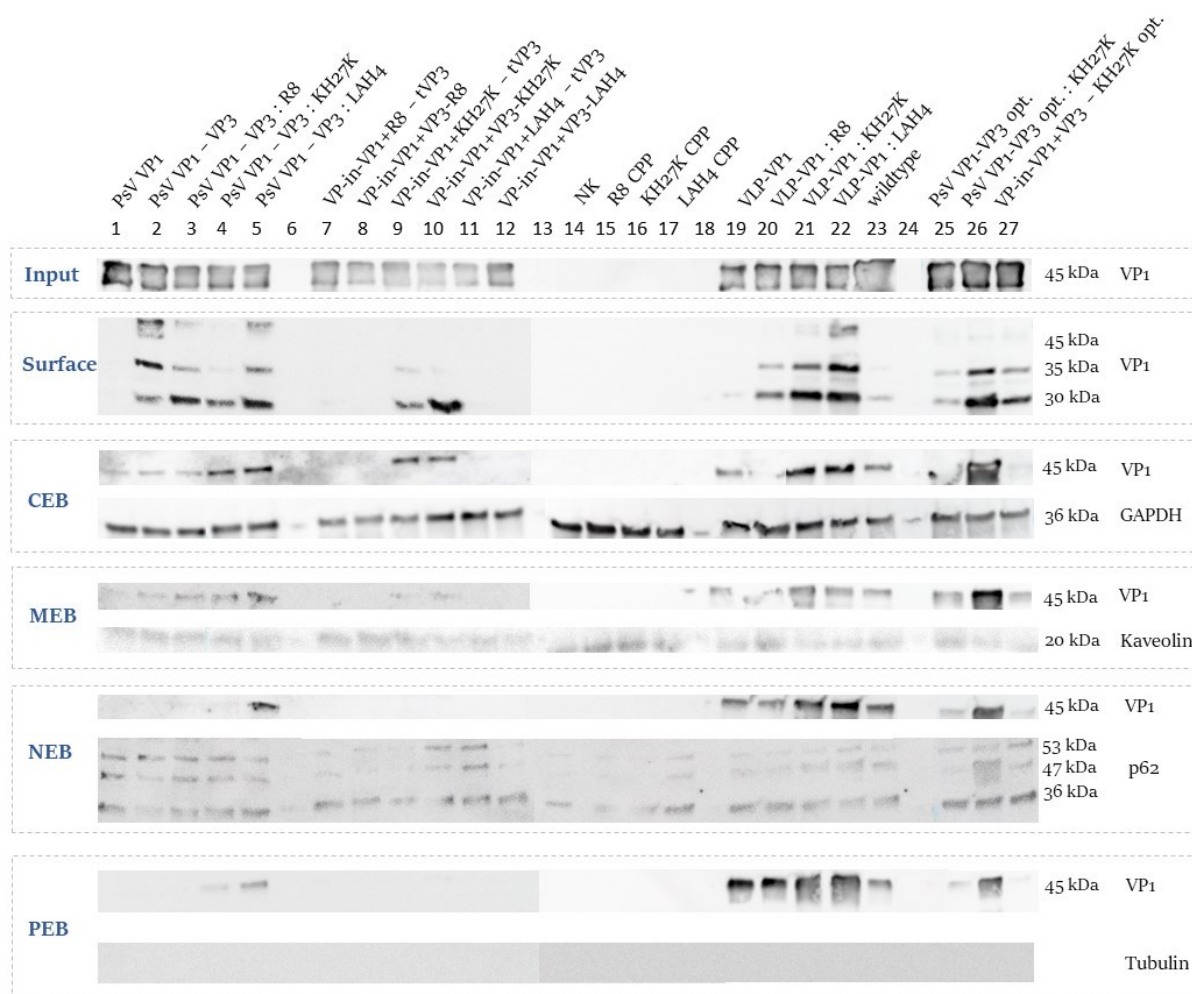


Obrázek 30 Snímky membrán částic po frakcionaci buněk pseudoinfikovaných s účastí peptidu R8 po imunologickém vyvolání. Membrány vyvolány protilátkou proti VP1 pro detekci virových částic, GAPDH jako marker frakce Cytosol a BiP jako marker frakce Rest. Vzorky pouze ko-inkubované s R8 jsou označeny „:“ mezi částicí a R8. Jako negativní kontrola bylo použito BSM. U vzorků označených jako NK (negativní kontrola) se jedná o tzv. „mock infekci“.

U frakcionace buněk, kdy pseudoinfekce probíhala s účastí peptidu R8 znovu pozorujeme nejsilnější signál VP1 v cytosolu i ve zbytkové frakci v případě ko-inkubace R8 s PsV-VP1+VP3_opt. Bohužel je ale pravděpodobné, že VP1 signál u ostatních částic v cytosolu je do jisté míry způsoben lehkou kontaminací ze zbytkové frakce. Zároveň byl detekován GAPDH i u vzorku *Surface*, což naznačuje zhoršený stav a stres buněk před začátkem frakcionace.

Pro přesnější představu, ve které části buňky se částice nachází, byl proveden experiment pomocí komerční soupravy Subcellular Protein Fractionation kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific) (viz kapitola 4.2.7.3), která umožňuje jemnější rozdělení buňky na více frakcí. Stejně jako u předchozích experimentů, bylo ponecháno vstupní množství virových částic 15 μ g, avšak na rozdíl od předešlé frakcionace byly buňky po celou dobu experimentu (4 hodiny) inkubovány v bezsérovém médiu. Po skončení inkubace bylo médium odebráno (s částicemi, které zůstaly v roztoku), buňky byly ošetřeny trypsinem a inhibitorem trypsinu a byl odebrán vzorek, který obsahoval částice, které se ve chvíli ukončení experimentu nacházely na buněčném povrchu, ale do buňky nevstoupily. Tento vzorek byl opět označen jako „*Surface*“. Následně bylo postupováno podle návodu s malými úpravami (viz kapitola 4.2.7.3), byla získána solubilní cytosolická frakce (CEB), membránová frakce (MEB), frakce jaderná (NEB) a frakce cytoskeletární (PEB). Stejně jako u předchozí frakcionace byly vzorky rozděleny SDS-PAGE, proteiny přeneseny z gelu na membránu a poté detekovány imunologicky pomocí protilátky proti VP1 (pro detekci virových částic) a proti markerům dané frakce (anti GAPDH pro CEB, anti caveolin pro MEB, anti p62 pro NEB a anti α tubulin pro PEB).

Tentokrát **experiment přinesl srovnání mezi VP-in napříč CPP, kontrolními částicemi a částicemi ko-inkubovanými s CPP**. Výsledek je na obrázku č. 31.



Obrázek 31: Snímky membrán částic po frakcionaci pomocí komerční soupravy po imunologickém vyvolání. Membrány vyvolány protilátkou proti VP1 pro detekci virových částic, GAPDH jako marker frakce CEB, kaveolin jako marker frakce MEB, p62 jako marker frakce NEB a α tubulinu jako marker frakce PEB. Vzorky pouze ko-inkubované s CPP jsou označeny „:“ mezi částicí a CPP. U vzorků označených jako NK (negativní kontrola) se jedná o tzv. „mock infekci“.

Ukázalo se, že v případě VP-in je možné detekovat nejsilnější signál VP1 u VP-in s KH27K v CEB. Naopak u pseudoinfekce probíhající v přítomnosti peptidu LAH4 je viditelný nejsilnější signál VP1 u částic v případě, že byly s peptidem pouze ko-inkubovány a to napříč frakcemi. Také srovnání pseudovirionů VP1+VP3 ko-inkubovaných s CPP ukazuje, že částice s LAH4 jsou nejúčinnější při internalizaci až do jádra. U peptidu R8 nejsou viditelné rozdíly proti kontrolním částicím, a to ani u VP-in, ani u ko-inkubace. Z této frakcionace se zdá, že ko-inkubace všemi CPP mimo jiné způsobí, že jsou částice mnohem více přichycené na povrchu buňky než částice kontrolní. Bohužel nebyl detekován marker cytoskeletární frakce, což však nemá na vyhodnocení experimentu zásadní dopad, díky poměrně úspěšné detekci markerů ostatních buněčných frakcí.

Po vyvolání membrán byly jednotlivé vzorky denzitometricky analyzovány vztažením k negativní kontrole, markeru frakce a vstupnímu množství částic. Získaná data v tabulce č. 12 byla vyhodnocena pomocí softwaru ImageJ.

Vzorky	CEB	MEB	NEB	Surface
PsV-VP1	2.73	0.83	2.73	0.00
PsV-VP1-VP3	2.92	2.34	3.57	1.21
PsV-VP1-VP3:R8	2.37	3.73	3.19	1.12
PsV-VP1-VP3:KH27K	6.56	4.78	2.94	0.64
PsV-VP1-VP3:LAH4	7.98	6.72	6.23	1.58
VP-in-VP1+R8-tVP3	4.27	2.12	2.20	0.10
VP-in-VP1+VP3-R8	3.46	2.24	0.87	0.06
VP-in-VP1+KH27K-tVP3	12.50	2.97	0.00	0.61
VP-in-VP1+VP3-KH27K	9.48	5.13	1.52	1.65
VP-in-VP1+LAH4-tVP3	0.00	2.69	1.72	0.06
VP-in-VP1+VP3-LAH4	0.50	1.63	0.99	0.02
VLP - VP1	17.30	31.82	6.88	0.08
VLP - VP1:R8	5.20	16.29	5.69	1.14
VLP - VP1:KH27K	33.55	135.25	15.46	3.23
VLP - VP1:LAH4	45.21	79.73	18.46	5.74
wildtype	14.86	27.80	5.48	0.33
PsV-VP1-VP3 opt.	14.42	15.79	0.68	0.63
PsV-VP1-VP3:KH27K opt.	47.36	288.88	2.51	4.02
VP-in-VP1+VP3-KH27K opt.	3.67	71.60	0.13	1.61

Tabulka 12: **Tabulka hodnot relativního množství VP1 po denzitometrickém vyhodnocení analýzy jednotlivých frakcí.** Jednotlivé hodnoty vyjadřují průměrnou intenzitu signálu VP1 na 1 pixel. Jednotlivé vzorky jsou normalizovány vůči markeru frakce, negativní kontrole a vstupnímu množství VP1. Frakce PEB do analýzy nebyla zahrnuta, protože se nepodařilo detekovat marker frakce. Vzorky pouze ko-inkubované s CPP jsou označeny „:“ mezi částicí a CPP. Data byla vyhodnocena pomocí softwaru ImageJ.

Tabulka hodnot po denzitometrickém měření frakcionace vychází z obrázku č. 31 snímků membrán po frakcionaci. Jak je z obou výstupů patrné, mezi virportéry-in je vyšší signál VP1, poukazující na vyšší počet přítomných částic, pouze v případě VP-in s KH27K ve frakci CEB naznačující únik do cytosolu. Porovnání experimentů, kde byla prováděna pouhá ko-inkubace virových částic s CPP naopak ukázalo zvýšený signál VP1 v případě ko-inkubace LAH4 s PsV a VLP proti kontrolním částicím PsV-VP1, PsV-VP1-VP3 a VLP-VP1 napříč frakcemi. Ko-inkubace VLP s KH27K odhalila silnější signál VP1 v případě

všech ko-inkubací proti kontrolním částicím VLP-VP1 i proti ko-inkubaci VLP s R8 napříč frakcemi. Nicméně v případě ko-inkubace PsV s KH27K lze silnější signál VP1 proti kontrolním částicím a ko-inkubaci s R8 detekovat pouze v případě frakcí CEB a MEB. Tento typ experimentu nám dal odpověď na lokalizaci jednotlivých částic uvnitř buňky.

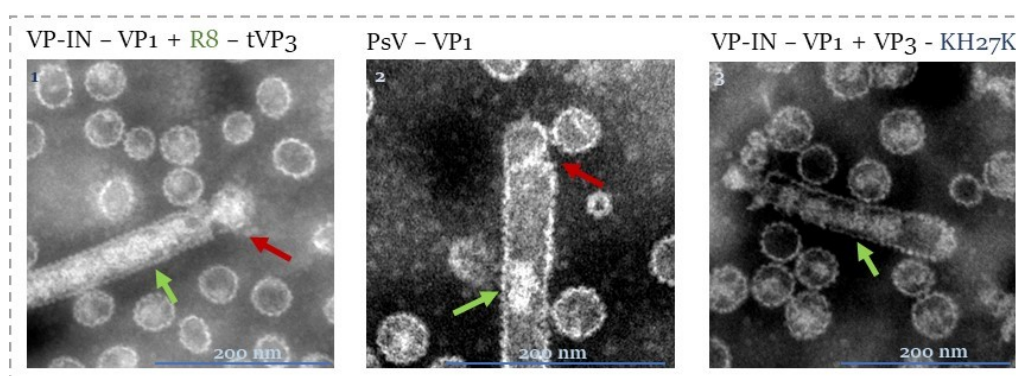
6 DISKUZE

V kontextu dlouhodobého výzkumu laboratoře virologie, který je zaměřen na možné využití viru podobných částic odvozených od polyomavirů pro vývoj diagnostických metod, vakcín a systémů pro přenos terapeutických látek do buněk, bylo cílem vytvořit a charakterizovat částice odvozené od myšího polyomaviru obsahující modifikovaný minoritní kapsidový protein VP3 na C či N konci. Modifikace se týkala kovalentního připojení peptidu penetrujícího membrány (CPP) a to buď peptidem LAH4 nebo peptidem bohatým na arginin (R8) či polyhistidinovým konstruktem KH27K složeným z 27 molekul histidinu ohraničených molekulou lysinu. Tyto tři CPP byly vybrány jako zástupci různých skupin CPP, buď proto, že jejich účinek na zlepšení dopravy genů pomocí virových vektorů byl pozorován v naší laboratoři nebo byl popsán v literatuře pro jejich potenciál zlepšovat přepravu částic odvozených od viru do cytosolu případně až do jádra (Futaki et al., 2001; Iwasaki et al., 2015; Y. Meng et al., 2021; Váňová et al., 2020). Cílem těchto modifikací bylo připravit částice, které by disponovaly vyšší účinností úniku z endolysosomálních kompartmentů a s tím spojenou efektivitou přenosu genů. Peptid KH27K má přítomností dlouhého řetězce histidinů potenciál účinně unikat z endosomu (Lo & Wang, 2008), LAH4 je kationický amfipatický peptid, u nějž byla již dříve potvrzena transdukční aktivita (Kichler et al., 2003) a kationický polyarginin má podobný transdukční potenciál jako předchozí zmíněný (Futaki et al., 2001). Částice odvozené od MPyV jsou složeny z proteinového obalu tvořeného proteinem VP1 a případně minoritními proteiny VP2 a/nebo VP3. Pro modifikaci částice se tedy nabízí modifikace proteinu VP1, nicméně povrchová modifikace může mít vliv jak na stabilitu celé částice (Polidarová, 2016), tak také na způsob internalizace do buňky (Váňová et al., 2019), a také na účinné cílení konkrétní buněčné tkáně. Proto se konstrukce modifikovaných částic zaměřila na úpravu minoritních kapsidových proteinů, jež jsou oba zanořeny dovnitř částice (Griffith et al., 1992). Nicméně připojení sekvence CPP na delší z nich, tedy VP2, by teoreticky mohlo bránit složení částice, proto byl pro modifikaci vybrán kratší VP3.

Pro produkci modifikovaných částic v savčím systému bylo nejdříve nutné připravit a charakterizovat expresní vektory pro produkci VP1 a modifikovaného proteinu VP3 pomocí KH27K. Postupné sekvenování zaklonovaných insertů do vektoru pWP-VP1 potvrdilo přítomnost sekvence pro VP3-KH27K a bylo přistoupeno ke kotransfekcím 293TT buněk. Pro porovnání účinnosti modifikace částic s KH27K byly produkovány i částice nesoucí protein VP3 modifikovaný LAH4 nebo R8, nicméně tyto plasmidy byly v minulých letech připraveny Mgr. Janou Váňovou a Mgr. Petrem Škvárou. Na základě předchozích zkušeností v laboratoři byl zvolen způsob izolace založený na narušení buněk tetrachlorethylenem, po které následuje ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu chloridu cesného. Tento protokol byl optimalizován pro izolaci pseudovirionů odvozených od polyomavirů Mgr. Janou Váňovou z původního postupu pro izolaci rekombinantních adenovirů zavedenou v Cardiffu v laboratoři

dr. Parkera (Oncolytic Adenovirus Virology lab, University Hospital of Wales, Health Park). Všechny virpotéry-in (VP-in, modifikované částice) a kontrolní pseudoviriony (PsV, nemodifikované částice) se podařilo bez problémů vyizolovat a charakterizovat. Jednotlivé VP-in a PsV byly izolovány vícekrát a pro každou izolaci byla provedena charakterizace. V průběhu diplomového projektu byly jednotlivé izolace částic využity k optimalizačním experimentům a nakonec byly sloučeny a znovu charakterizovány změřením proteinové koncentrace a novými EM snímky před finálními experimenty prezentovanými v této diplomové práci.

Na snímcích z elektronového mikroskopu (viz obrázek č. 20) je možné pozorovat patrné, že ve všech případech transfekce došlo ke vzniku intaktních částic s očekávanou velikostí přibližně 50 nm. V případě vzorků VP-in-VP1+KH27K-tVP3 a VP-in-VP3+KH27K je viditelné mírné zvětšení částic, které indikuje přítomnost modifikovaného proteinu VP3, neboť se jedná o částice s nejdelším připojeným peptidem. U vzorků VP-in-VP1+VP3-KH27K, VP-in-VP1+VP3-KH27K opt., VP-in-VP1+LAH4-tVP3, VP-in-VP1+R8-tVP3, VP-in-VP1+R8-tVP3+VP2, PsV-VP1, PsV-VP1+VP3 a PsV-VP1+VP3 opt. byly detekovány kromě samotných ikosahedrálních částic i částice tubulárních útvarů (viz obrázek č. 21). Podobné útvary pozoroval Erickson a kolegové v jádře při infekci buněk myším polyomavirem (Erickson et al., 2012). Dle autorů je možné, že tubuly jsou tvořeny jednotlivými proteiny VP1 a napomáhají DNA se zabalit do částice. DNA s histony podle nich putuje středem takového útvaru a na koncích dochází k „pučení“ nových plných virionů (Erickson et al., 2012). Stojí za zmínku, že se při analýze VP-in a PsV preparací podařilo zachytit situaci, která by se dala interpretovat jako „pučení“ virové částice z dlouhých tubulů, jak je vidět na obrázku č. 32. Vznik různých typů virových částic, včetně tubulárních útvarů, byl u polyomavirů však opakovaně pozorován i v případech, kdy byl indukován vznik částic v podmínkách in vitro (Kanesashi et al., 2003; Salunke et al., 1989). Je tedy možné, že ke vzniku tubulárních útvarů dochází při agregaci materiálu v průběhu izolace.



Obrázek 33: **Snímky VP-in a PsV pořízené z pozorování vzorků připravených metodou negativního barvení elektronovým mikroskopem.** Červenými šipkami je vyznačena oblast, ve které pravděpodobně dochází k „pučení“ ikosahedrálních viru podobných částic z dlouhého tubulárního útvaru, jež je v literatuře popsán jako „schránka ze spojených VP1 molekul“. Zelené šipky poté vyznačují oblast tubulárního útvaru uvnitř kterého je pravděpodobně DNA. Plné částice (obsahující DNA) jsou totiž popisovány jako částice se „světlym vnitřkem“, prázdné částice naopak jako částice s „vnitřkem tmavým“. Snímky 1,3 jsou foceny se zvětšením 120 000x, Snímek 2 je focen se zvětšením 150 000x. V pravém dolním rohu je znázorněna úsečka reprezentující velikost 200 nm.

V průběhu optimalizačních experimentů a na základě některých snímků z TEM, vyvstala obava, zda v některých vzorcích nejsou přítomny kromě částic i stopy organického činidla, a protože izolace probíhala s narušením buněk pomocí TCE, lze se domnívat, že to mohlo být způsobeno právě jeho zbytkovým množstvím. Proto bylo přistoupeno k další izolaci částic VP-in-VP1+VP3-KH27K a PsV-VP1-VP3 tentokrát metodou Optiprep pomocí ultracentrifugace v gradientu jodixanolu.

Proces přípravy jednotlivých vzorků zahrnoval řadu kontrol, mezi nimiž bylo i restriční štěpení či sekvenování jednotlivých pWP-CPP plasmidů, které potvrdily přítomnost genů pro modifikované proteiny ve vektorech, jenž byly následně použity pro transfekce. Nicméně následná analýza bohužel ukázala, že nelze detekovat protein VP2 a to v žádných vzorcích (data nepřiložena), proto byly všechny částice s tímto proteinem vyloučeny z následných experimentů.

Přítomnost jednotlivých proteinů v částicích byla ověřována rozdělením proteinů pomocí SDS-PAGE, následným přenosem proteinů na nitrocelulózovou membránu a obarvením membrány komerčním roztokem s citlivostí již 3 ng proteinu (viz obrázek č. 22). Poté bylo přistoupeno k imunologickému barvení, které potvrdilo přítomnost proteinu fúzních variant VP3 u všech vzorků s výjimkou VP-in-VP1+LAH4-tVP3 a VP-in-VP1+VP3-LAH4 (viz obrázek č. 23). U tohoto vzorku bylo množství proteinu VP3 pravděpodobně pod detekčním limitem metody. Navíc je ze snímků membrány vyvolané proti proteinu VP1 viditelné (viz obrázek č. 25), že se nepodařilo dosáhnout shodné nanášky u všech vzorků, konkrétně u vzorků VP-in-VP1+LAH4-tVP3 a VP-in-VP1+VP3-LAH4 bylo nejnižší. Je pravděpodobné, že díky modifikacím nebylo dosaženo teoretického maximálního množství zastoupení VP3 varianty proteinu v částicích, které činí u viru 72 molekul (a tedy je poměr VP1:VP2/3 5:1). U vzorků VP-in-VP1+LAH4-tVP3 a VP-in-VP1+VP3-LAH4 se pravděpodobně modifikovaný VP3 nachází ve velmi malém množství, pokud vůbec. V současné době probíhá analýza pomocí hmotnostní spektroskopie, která by měla pomoci přítomnost CPP ve vzorcích potvrdit. V následných analýzách se nepodařilo přímo prokázat ani přítomnost polyhistidinové modifikace ve vzorcích VP-in-VP1+KH27K-tVP3 a VP-in-VP3+KH27K. K tomu byla použita protilátka, která je připravována s použitím syntetického imunogenu: peptidu HHHHHH, tedy sekvence označované 6xHis-Tag. Pro modifikované varianty VP3 byl čekáván signál přibližně 13 kDa, v případě zkrácené varianty VP3, a 26 kDa, v případě varianty obsahující

celý VP3. V tomto případě bohužel došlo k detekci pouze pozitivní kontroly (viz obrázek č. 24). V případě pozitivní kontroly se jednalo o purifikované VLP složené z VP1 proteinu na jehož C-konci se nachází 6xHis-Tag, tedy klasická varianta polyhistidinové kotvy se 6 histidiny. Ani použití jiné protilátky (His-Probe H-3) která je připravována s použitím syntetického imunogenu: peptidu HHH, ani detekce pomocí metody Dot blot, která umožňuje přímou analýzu nativního proteinu na nitrocelulózové membráně, nepřineslo očekávaný výsledek (viz obrázek č. 26 A, 27 A, B). Problém detekce proteinů s polyhistidinovou kotvou pomocí protilátek namířených na 6xHis-Tag je však v literatuře již dříve popsán (Debeljak et al., 2006; Hanittinan et al., 2020). Dle Hanittinana může docházet i přes redukční podmínky při SDS-PAGE ke skládání proteinu, které může znemožnit navázání protilátky. Debeljak testovala 4 různé protilátky cílené na epitopy 4xHis, 5xHis, 6xHis a RGSHHHH na vícero proteinech s polyhistidinovou kotvou (6xHis-tag), u kterých byla potvrzena přítomnost molekul histidinu kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. Testovány byly jak nativní, tak denaturované vzorky pomocí metody Dot Blot a poté i denaturované rozdělené SDS-PAGE, přenesené na membránu a imunobarvené. Pomocí metody Dot blot nativních vzorků nebyl v případě nepurifikovaných vzorků, tedy pouze zakoncentrovaného lyzátu, detekován ani jeden konstrukt a to ani v případě pozitivních kontrol, jimiž byla myší dihydrofolát reduktáza s navázaným 6xHis-Tag na C konci a lidský selenium vázající protein s 6xHis-Tag na N konci. Z purifikovaných 3x očištěných vzorků byly detekovány všechny, avšak pouze jedinou ze čtyř protilátek (H4) a nikoliv pozitivní kontroly, které byly přečištěny pouze jednou. Naopak při denaturační elektroforéze nepurifikovaných vzorků a jednou přečištěných pozitivních kontrol, bylo možné detekovat všechny vzorky, ale znovu pouze jednou (H4) protilátkou a pozitivní kontroly všemi protilátkami, ovšem s velmi rozdílnou citlivostí. Dle Debeljak hraje v případě Dot blotu roli, zda jsou konstrukty purifikovány od ostatních proteinů, které mohou inhibovat navázání protilátky, což ovšem není případ denaturačních metod. U těch je nutné poznamenat, že rozdíl i jen jediné aminokyseliny v sekvenci, kterou má protilátka proti His-Tag rozpoznávat, může velmi změnit účinnost. Dalším vysvětlením dle ní může být, že spolu interagují jednotlivé molekuly histidinu v rámci sekvence v kapce SDS a stávají se tak nepřístupné pro protilátku (Debeljak et al., 2006). V našem případě však protilátka nedetkovala ani samotný CPP KH27K, zatímco pozitivní kontrolu ano, jímž byl VP1 protein s navázaným 6xHis-tag, který by měl být primárně rozeznávaný našimi protilátkami. Rozdílem je tedy počet molekul histidinu, který bude v tomto případě hrát pravděpodobně nejzásadnější roli, protože ačkoliv po izolaci VP1-6xHis-Tag následovalo dodatečné přečištění pomocí sacharóзовého polštáře, VP-in byly dostatečně purifikovány také. Ačkoliv se nepodařilo pomocí protilátek KH27K na VP-in detekovat, lze se z molekulových hmotností proteinu VP3 domnívat, že je modifikovaný. Neboť varianta VP-in-VP1-VP3+KH27K má větší kDa velikost proti standardnímu nemodifikovanému VP3 a naopak varianta VP1-in-KH27K-tVP3 se zkráceným VP3 má dle rozdělení na gelu kDa velikost menší a navíc by

mělo tomto případě nejdříve docházet k přepisu KH27K a až poté VP3. Pokud by nedocházelo k přepisu KH27K, nemohl by vznikat protein VP3, který se však podařilo pomocí protilátky proti VP3 proteinu detekovat.

Neboť byly VP-in produkovány primárně pro ověření účinnosti transdukce v porovnání s nemodifikovanými částicemi, bylo nutné charakterizovat množství zabalené DNA uvnitř částic, aby následný transdukční - luciferázový test mohl být nastaven dle množství reportérové DNA uvnitř částic. Pro charakterizaci jednotlivých částic bylo **množství enkapsidované pDNA kvantifikováno pomocí qPCR** se specifickými primery. Na základě předchozích zkušeností v laboratoři byla pDNA nejdříve izolována z jednotlivých částic a poté kvantifikována. Očekávalo se, že pozitivně nabité peptidy, tedy LAH4 a R8 interagující se záporně nabitou DNA pomocí elektrostatických interakcí (Kichler et al., 2003) by mohly napomoci zabalení pDNA dovnitř pseudokapsidy. Kvantifikace však ukázala, že nejvíce zabalené pDNA neobsahovaly VP-in s modifikací LAH4 nebo R8, ale VP-in-VP1+VP3-KH27K a naproti tomu nejméně nemodifikované PsV-VP1-VP3 opt (viz graf č. 1). V tomto ohledu je zajímavé zmínit, že vzorky izolované pomocí ultracentrifugace v gradientu jodixanolu se na snímcích jevíly rozvolněné a obsahovaly pravděpodobně rozpadlý materiál (viz obrázek č. 20), což vysvětluje malý obsah enkapsidované DNA při relativně vysokém proteinovém výtěžku purifikací. Překvapením byl výsledek získaný u kontrolního vzorku PsV-VP1. Množství enkapsidované pDNA bylo významně vyšší než u vzorků PsV-VP1-VP3, což nekoresponduje s výsledky v diplomové práci Mgr. Petra Škváry (Škvára, 2020), dle kterého byl právě vzorek PsV-VP1 jedním z nejméně účinných co do množství zabalené pDNA, avšak připouští, že se jedná o výsledky pouze z jedné izolace, čímž může být výsledek zkreslený. Variabilní zastoupení pDNA mezi vzorky může být způsobeno tím, že při izolacích byly vždy sloučeny frakce, které dle refraktometrických indexů měly obsahovat „plné“ částice, tedy částice pravděpodobně obsahující DNA. DNA se však do částic balí do nespecificky (Španielová et al., 2014), a tak se do nich dostává také hostitelská buněčná DNA či její fragmenty (Forstová et al., 1995; Gillock et al., 1997). U papilomavirových vektorů připravených stejným způsobem kotransfekcemi byla stanovena efektivita enkapsidace plasmidové DNA na hranici 5%, přičemž do zbylých kapsid byla zabalena buněčná DNA (Buck et al., 2004). Bayer, který produkoval papilomavirové vektory také stejným způsobem ve své práci uvádí, že sekvenování izolované DNA z částic opravdu odhalilo buněčnou DNA zabalenou dovnitř částic (Bayer et al., 2018). Pravděpodobně tedy došlo k zabalení jak plasmidové, tak také hostitelské buněčné DNA i v případě těchto VP-in a PsV.

Produkové částice charakterizované množstvím zabalené pDNA již bylo možné použít pro **ověření efektivitu transdukce**, která byla stanovena u vzorků VP-in, PsV a PsV ko-inkubovaných s CPP **pomocí luciferázového testu**, ve kterém bylo množství transdukovaného reportérového genu

pro luciferázu měřeno na základě luciferázového signálu. Luciferázový test s VP-in odhalil, že nejúčinnějšími vektory pro přenos DNA do jádra jsou VP-in-VP1+R8-tVP3, které vyšly v tomto typu experimentu více než 5x účinněji než kontrolní PsV-VP1-VP3 (viz graf č. 2). Všechny modifikované virportéry-in, s výjimkou VP-in-VP1+VP3-LAH4, vykazovaly mírně zvýšenou účinnost transdukce. Nicméně nelze spolehlivě říci, zda může hrát roli rozdíl v modifikaci mezi C a N koncem proteinu. V případě VP-in s LAH4 a R8 byla efektivnější varianta se zkráceným VP3, tedy s modifikací na N konci, naopak u modifikace KH27K byla mírně účinnější varianta s plnodélkovým VP3, tedy modifikací na C konci.

Výsledky získané pro VP-in-VP1+LAH4-tVP3 (malé zvýšení transdukční účinnosti) a VP-in-VP1+VP3-LAH4 (snížení) ostře kontrastují s výsledky experimentů, kdy byl zkoumán účinek ko-inkubace CPP s PsV-VP1-VP3 na efektivitu přenosu. Ko-inkubace s LAH4 velmi výrazně zvyšovala transdukci do jádra, podobně jak již bylo v naší laboratoři pozorováno u virové infekce nebo pseudoinfekce (Váňová et al., 2020), a to více než 40- násobně. Naopak ko-inkubace s KH27K a R8 CPP transdukci nijak významně nezvyšovala. Tento výsledek se liší od dříve publikovaných dat (Váňová et al., 2020), ale je třeba brát v potaz, že předchozí experimenty byly prováděny s pseudoviriony, které obsahovaly VP2 protein. VP2 protein obsahuje proti proteinu VP3 hydrofobní domény (Huerfano et al., 2010) a může díky své membránové aktivitě zvyšovat účinek CPP při virové infekci a pseudoinfekci. V tomto ohledu je velmi překvapivý výsledek získaný pro PsV-VP1, který ukázal, že PsV-VP1 transdukují efektivněji než PsV-VP1-VP3 i než některé VP-in (VP-in-VP1+KH27K-tVP3, VP-in-VP1+LAH4-tVP3, VP-in-VP1+VP3-LAH4, VP-in-VP1+VP3-LAH4). U částic složených pouze z VP1 bylo publikováno, že v buňkách permissivních pro virus (3T6) pravděpodobně nevstupují až do jádra, nýbrž se dostávají pouze k jaderné membráně (Richterová et al., 2001), avšak zmiňovaná publikace nevyužívala vzhledem k době svého vzniku mikroskopických technik s vysokým rozlišením a při velmi malém množství virových částic, které při infekci do jádra vstupují (Mannová & Forstová, 2003) nelze vyloučit, že takové částice nebyly při vstupu upozorovány. Faktem však zůstává, že virové mutanty postrádající minoritní kapsidové proteiny nejsou infekční a mají defekt v časných fázích infekce (Mannová et al., 2002). Kromě jejich úlohy v přenosu viru z ER se pravděpodobně podílejí na interakci s receptorem (Caruso et al., 2003) a tím zprostředkovaně na nasměrování viru na produktivní dráhu. Jak ukázala Soldatová ve své práci NLS proteinu VP1 je dostatečně silný na to, aby dokázal dopravit genom do jádra bez potřeby minoritních proteinů (Soldatova et al., 2018). Nelze tedy vyloučit, že v případě interakce virových částic mohou být při transdukci v 293TT méně závislé na interakcích s přirozeným receptorem viru a tedy i na přítomnosti minoritních proteinů. Z hlediska předchozích experimentů v laboratoři se však jedná u PsV-VP1 o naprosto raritní výsledek, například v předchozí práci Mgr. Škváry (Škvára, 2020) PsV-VP1 nebyly

schopny transdukovat pDNA, přestože se jednalo o stejný buněčný systém. Pravděpodobně si tak nelze vytvořit absolutní závěr, neboť se mohou lišit i jednotlivé preparace mezi sebou, jak bylo pozorováno v rámci diplomového projektu. To lze dobře dokumentovat také na porovnání účinnosti transdukce mezi stejnými a shodně připravenými pseudoviriony lišící se pouze metodou izolace (PsV-VP1-VP3, které byly izolovány pomocí ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl a PsV-VP1-VP3 izolované pomocí ultracentrifugace v gradientu jodixanolu). Srovnání odhalilo, že se liší efektivita přenosu i mezi stejnými částicemi pouze s odlišným postupem izolace.

Zvýšení transdukční účinnosti může být způsobeno různými vlivy jako je kondice buněk, čistota a stabilita vyizolovaných částic, efektivita uvolnění enkapsidované pDNA včetně možnosti, že CPP indukují únik částic z endocytických kompartmentů (endosomy, lysosomy, ER). Pro průkaz úniku částic do cytosolu nejsou k dispozici triviální experimentální metody (Martens et al., 2014). V rámci této práce byla proto zvolena metoda buněčné frakcionace. Nejdříve byla vyzkoušena jednodušší „skrínigová“ metoda inspirovaná již publikovanou studií, která tento způsob úspěšně využila (Inoue & Tsai, 2011) a která dovoľovala po jemné permeabilizaci plasmatické membrány digitoninem separovat cytosolickou frakci od zbytku buněk. Bylo předpokládáno, že nemodifikované částice budou více ve zbytkové frakci a VP-in s modifikací naopak spíše v cytosolické frakci. Frakcionace však překvapivě ukázala, že v cytosolické frakci lze detekovat pouze částice, které byly před „infekcí“ ko-inkubovány s CPP, konkrétně VLP-VP1:KH27K, PsV-VP1-VP3:KH27K opt., VLP-VP1:LAH4, PsV-VP1-VP3:LAH4 opt., VLP-VP1:R8, PsV-VP1-VP3:R8 opt., a v některých případech také samotné PsV-VP1-VP3, PsV-VP1-VP3 opt. a VLP-VP1, avšak ve výrazně nižším množství proti ko-inkubovaným variantám částic (viz obrázky č. 28, 29 a 30). Dle Soldatové může být jedním z vysvětlení, proč lze v cytosolu detekovat velmi malé množství proteinu VP1, že jakmile se VP1 do cytosolu dostane, je buď přeměrován do jádra či degradován proteázami (Soldatova et al., 2018). Nelze tedy vyloučit, že CPP mohou při ko-inkubacích kromě předpokládané destabilizace membrán endosomu/lysosomu/ER působit také tak, že vlivem jejich aktivity dojde k akumulaci většího množství virových částic na buněčném povrchu a vstup částic se tak synchronizuje. V takovém případě by se mohlo v okamžiku analýzy nacházet v cytosolu relativně vysoké množství virových částic, které při přirozené infekci vstupují postupně a jsou odtud rychle a průběžně odstraňovány, ale v případě synchronizovaného masivního vstupu není odstraňování tak rychlé a VP1 protein tak mohl být v cytosolu detekován.

S tím by korespondovaly i výsledky následné jemnější analýzy vnitrobuněčné lokalizace virových částic komerční soupravou (*Subcellular Protein Fractionation kit for Cultured Cells* (Thermo Fisher Scientific) (viz obrázek č. 31). Tato analýza ukázala, že v případě ko-inkubace částic s peptidy lze ve srovnání s kontrolním vzorkem PsV-VP1-VP3 (bez ko-inkubace s CPP) pozorovat nejvyšší sílu signálu

VP1 u částic s LAH4 napříč buněčnými frakcemi, částice s KH27K jsou nejvíce v prvních dvou frakcích, tedy ve frakci cytosolické a membránové, poté je již signál VP1 nižší proti částicím s LAH4 a u částic s R8 lze pozorovat stejný nebo dokonce nižší signál VP1 napříč frakcemi. Pozorování koresponduje se studií Iwasakiho, který porovnával účinnost vstupu R8 peptidu s polyhistidinovými peptidy do šesti různých savčích buněčných linií a u všech shledal násobně vyšší procento vstupu do buňky u PHP (Iwasaki et al., 2015). V případě LAH4 se předpokládá, že u peptidu dochází k nespecifickým elektrostatickým interakcím s buněčnou membránou a navázání na sulfátové proteoglykany (Kichler et al., 2006). Z obrázku číslo 31 je patrné, že u částic PsV-VP1-VP3, PsV-VP1-VP3:R8, PsV-VP1-VP3:KH27K, PsV-VP1-VP3:LAH4, VP-in-VP1+VP3-KH27K, VP-in-VP1+KH27K-tVP3, VLP-VP1:R8, VLP-VP1:KH27K, VLP-VP1:LAH4, PsV-VP1-VP3 opt., PsV-VP1-VP3:KH27K opt., VP-in-VP1+VP3-KH27K opt. došlo v některých případech k masivní asociaci virových částic s buněčným povrchem, přičemž nedošlo k internalizaci do buněk, nýbrž k pouhému zachycení na povrchu a k následnému odstranění po inkubaci buněk s trypsinem s proteolytickou aktivitou. Nepřítomnost částic konjugovaných s CPP R8 v cytosolu je však je v souladu s publikací Patel a kolegů, kteří se pokoušeli mapovat intracelulární lokalizaci GFP proteinu fúzaného s různými CPP, včetně R8 a jeho cyklické varianty. R8-GFP sice efektivně vstoupil do buňky, ale nebylo možno ho detekovat v cytosolu. (Patel et al., 2019). Stejně tak Luo a kolegové při intracelulárním mapování osudu fluorescenčních polymerních teček (Pdots) s elektrostaticky absorbovanými R8 peptidy nezaznamenali jejich uvolňování do cytosolu ihned po vstupu do buněk. Jejich výsledky nicméně naznačily, že R8-Pdots se vyhnuly lysosomální degradaci díky tomu, že po internalizaci kaveolinovou dráhou indukovaly vznik autofagosómů (24 hodin po vstupu) akumulovaných v cytoplasmě, ale přímo jejich uvolnění do cytosolu neprokázali (Luo et al., 2019).

Jedním z předpokladů efektivního úniku částic funkcionalizovaných peptidem LAH4 z endosomu pomocí destabilizace membrán je jeho dostatečná koncentrace v systému a není vyloučeno, že stejně jako při analýzách membránové aktivity LAH4 (Wolf et al., 2017), je nutné aby v systému existovaly molekuly LAH4 ve volné formě. Možným vysvětlením, proč lze částice s LAH4 detekovat napříč frakcemi pouze pokud byly s CPP ko-inkubovány, může být nedostatečná koncentrace LAH4 peptidu ve virportérech-in a přímý membránový účinek volného LAH4. Je tedy pravděpodobné, že v případě frakcionace byla koncentrace LAH4 peptidu ve VP-in-VP1+LAH4-tVP3, VP-in+VP3-LAH4 pod hraniční hodnotou možné aktivity. Druhým možným vysvětlením neúspěšného úniku z endosomálních kompartmentů VP-in modifikovaných LAH4 u frakcionace může být fakt, že u částic nedošlo k dostatečnému rozvolnění a tedy možnosti aktivního účinku peptidu LAH4. Dle snímků z elektronového mikroskopu je patrné (viz obrázek č. 20), že VP-in modifikované KH27K jsou mírně větší a rozvolněnější, to je pravděpodobně důsledkem

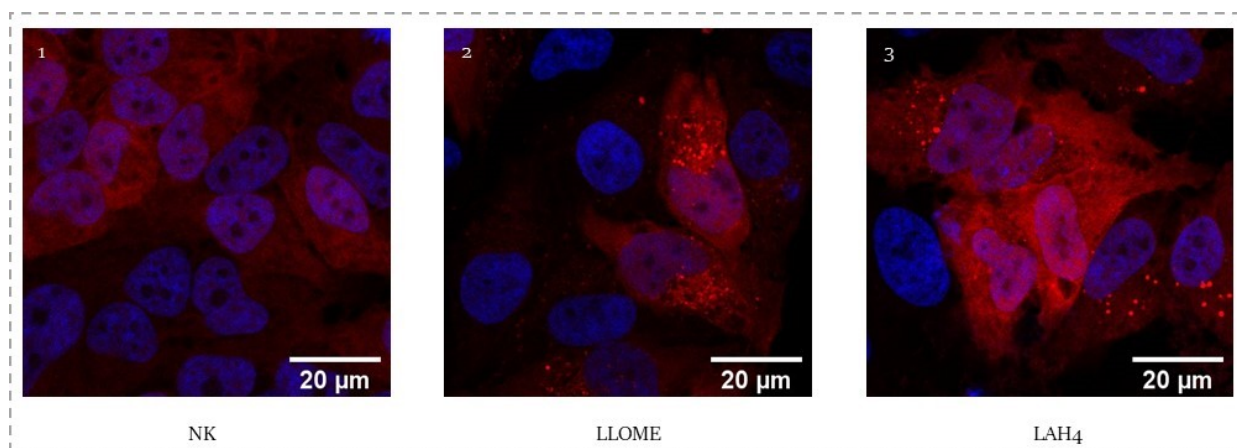
délky peptidu KH27K. Zdá se tedy, že kombinace nízké koncentrace a kompaktnosti VP-in-LAH₄ zamezila jejich možnému úniku z endosomu/ER nebo lysosomu.

Rozdílné výsledky účinnosti transdukce, dle které je nejefektivnějším vektorem VP-in-VP₁+R8-tVP₃, nicméně ve frakcionaci VP-in s R8 téměř nedetekujeme, můžou být způsobeny několika faktory. Zaprvé je třeba zmínit, že pro oba experimenty byly využity rozdílné buněčné linie (293TT pro luciferázový test a 3T6 pro frakcionaci). Dle studie z roku 2019 (Patel et al., 2019) **efektivita vstupu a následného úniku z endosomu kromě sekvence CPP velmi závisí na typu buněčné linie**. Patel a jeho kolegové fúzovali CPP (silně kationický penetratin, R8 a TAT a méně kationický transportan) s eGFP a pozorovali, že intenzita fluorescence se výrazně snížila v případě HeLa a HEK buněk naproti buněčnému typu 10T1/2, u kterého byly velmi efektivní kationické CPP. Naproti tomu v buňkách HepG2 byl nejvíce detekován CPP transportan, Nicméně se zdálo, že ač došlo k efektivnímu vstupu do buňky, žádný z CPP neindukoval únik z endosomu. Proto vytvořili cyklickou strukturu CPP zavedením cysteinového zbytku na oba konce CPP, čímž sice zesílili úspěšnost vstupu, jak bylo již popsáno v literatuře (Tunemann 2011), ale opět nebyla detekována žádná úniková aktivita ani v jedné z testovaných buněčných linií. Avšak autor uvádí, že v případě že by docházelo k úniku pouze malého množství peptidu, byl by únik velmi obtížně detekovatelný (Patel et al., 2019). Je tedy možné, že rozdíl buněčné linie mezi luciferázovým testem a frakcionací způsobil odlišnosti mezi výsledkem těchto experimentů. Rozdílný **vliv CPP na uvolňování obsahu z endosomu** byl dobře popsán díky studiu **struktury peptidu**, studiu uspořádání CPP v tom smyslu, zda se jedná o větvený či lineární peptid, ale i studiu **pH endosomu**, které se liší napříč buněčnými liniemi. Chen et al., (2002) studoval vliv uspořádání jednotlivých aminokyselin v polymeru a dle závěrů jeho skupiny kationické liposomy s inkorporovanými lineárními nebo rozvětvenými polymery složenými z molekul histidinu a lysinu vykazovaly různou účinnost úniku z endosomu napříč buněčnými typy. Prvotně se zdálo, že obecně účinněji unikají polymery rozvětvené, což mohlo být částečně způsobeno menší velikostí celého komplexu. Později ale v jiných buněčných typech byly úspěšnější naopak komplexy s lineárním polymerem. Jako vysvětlení nabízel rozdíl endosomálního pH v buněčných liniích. Konkrétně v primárních buněčných liniích bylo detekováno velmi kyselé pH uvnitř endosomu a v tomto případě byly mnohem účinnější NP s lineárním polymerem, zatímco v maligních nebo transformovaných buňkách s vyšším pH v endosomu, byly účinnější polymery rozvětvené. Přestože je známa celá řada faktorů, které endosomální pH ovlivňují jako je iontové složení a membránový potenciál (Rybak et al., 1997), přesný mechanismus nebo příčina, proč se pH mezi jednotlivými buněčnými liniemi liší, není znám. U běžně kultivovaných buněčných liniích může být rozdíl způsoben mimo jiné délkou kultivace (Rybak & Murphy, 1998), proto se Rybakova skupina rozhodla studovat, zda lze detekovat rozdíly v pH endosomu i *in vivo*. Pro tyto účely byly vytvořeny adherentní

primární buňky z myších ledvin a srdce a měření ukázalo rozdíl v pH endosomu i v tomto případě. Zatímco v endosomu srdečních buněk bylo detekováno pH 5,5, u endosomu ledvinných buněk bylo pH mírně vyšší a to 6,0. Rozdílné pH u jednotlivých buněčných linií by tedy nemělo být opomenuto při navrhování optimálního nosiče terapeutických látek. V posledních letech byla vyvinuta celá řada metod využívajících fluorescenční sondy (shrnutí v C. Wang et al., 2017), funkcionalizované NP (F. Wang et al., 2012) a mikrospektroskopie (Hou et al., 2017) pro snímání intracelulárního – endosomálního pH. Peptid R8 může být tedy membránově aktivní v rámci VP-in-VP1+R8-tVP3 pouze v buňkách 293TT díky příznivému pH v endosomech na rozdíl od situace v buňkách 3T6. Tuto hypotézu podporuje i skutečnost, že buněčná linie 3T6 patří mezi obtížně transfekovatelné linie, zatímco buňky 293TT byly odvozeny od linie HEK 293, která patří mezi oblíbené buněčné linie pro snadné transfekce a účinné exprese heterologních genů. Snadná „transfekovatelnost“ tedy může souviset s tím, že v této buněčné linii je endolysosomální systém lépe nastaven pro usnadnění úniku materiálu z endosomů/lysosomů.

Součástí tohoto diplomového projektu byla i příprava buněčné line, která by dovolila pozorovat narušení endosomální/lysosomální membrány v reálném čase. Jednalo se o linii odvozenou od HeLa buněk, která byla ustavena selekcí po transfekci plasmidu exprimujícího galektin 3 fúzovaný s fluorescenčním proteinem mCherry (Gal3-mCherry). Galektin je rozpustný neglykosylovaný lektin, který váže β galaktosidy (Barondes et al., 1994) a shlukuje se v místech, ve kterých je porušená membrána (Du Rietz et al., 2020; Wittrup et al., 2015). Pro ověření, zda lze detekovat rozrušení endosomální membrány, byly v předběžných experimentech VP-in, PsV i samotné CPP inkubovány s touto buněčnou linií MV1A a následně byly buňky fixovány a analyzovány pomocí konfokální mikroskopie Mgr. Janou Váňovou. Překvapivě se ukázalo, že ani u vzorků částic, které lze pomocí frakcionace detekovat v cytosolu (VP-in-VP1+KH27K-tVP3, VP-in-VP1+VP3-KH27K, VLP-VP1:KH27K, PsV-VP1-VP3:KH27K opt., VLP-VP1:LAH4, PsV-VP1-VP3:LAH4 opt., VLP-VP1:R8, PsV-VP1-VP3:R8 opt., a v některých případech také samotné PsV-VP1-VP3 a PsV-VP1-VP3 opt., VLP-VP1) se narušení endosomálního váčku pomocí Gal3-mCherry shluků zachytit nepodařilo. Vysvětlením může být pozorování Rehmana (Rehman et al., 2013), který mikroskopií živých buněk inkubovaných s kationickými polyplexy potvrdil hypotézu protonové houby, nicméně zdůraznil, že se jedná o velmi dynamický buněčný proces trvající několik málo minut a nelze potvrdit kompletní lýzi endosomu. Je tedy možné, že ve chvíli fixace již nebylo možné rozrušení membrány detekovat, protože již byla znovuobnovena (fúzována s cytoplazmatickou membránou po uvolnění nedegradovatelného obsahu do vnějšího buněčného prostoru (Medina et al., 2011). Nebo došlo pouze k mírné destabilizaci, které není buněčnými senzory membránového poškození (tj. galektiny) rozpoznáno a ke vzniku Gal3 shluků nedochází. Jako pozitivní kontrola byl využit L-leucyl-L-leucin methyl ester (LLOME), který vstupuje do buňky endocytózou a po vstupu do endosomu

či lysosomu je dipeptidylpeptidázou I přeměněn na polymer schopný lytické aktivity (Thiele & Lipsky, 1990). LLOME je využíváno pro studium opravy a uvolnění z endosomu a mechanismů spojených s poškozením lysosomu (Eriksson et al., 2020; Kondow-Mcconaghy et al., 2020). Je zajímavé, že z testovaných CPP byl LAH4 jediný, který při inkubacích (20 μ M) dokázal indukovat vznik těchto shluků sám o sobě (viz obr. č. 34, Jana Váňová et al, rukopis v přípravě)



Obrázek 34 **Snímky MV1A buněčné linie po inkubaci s NK, LLOME a LAH4 pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu.** Na prvním snímku jsou buňky MV1A exprimující fúzaný galektin-3 mCherry s negativní kontrolou, jimž bylo médium. Druhý snímek jsou buňky MV1A inkubované s 0,5 mM LLOME. Na třetím snímku jsou MV1A buňky inkubované s 20 μ M LAH4. Buňky byly se všemi vzorky inkubovány 1,5 hodiny v bezsérovém médiu a poté bylo přidáno médium se sérem. Po 4 hodinách inkubace ve 37°C byly buňky fixovány, montovány do DAPI a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Snímky jsou výsledkem 2 spojených kanálů, kdy červená barva signalizuje GAL3-mcherry, modrá barva DAPI značí jádra. Červené shluky na snímcích 2 a 3 značí poškození endosomální membrány a zvýšenou koncentrací Gal3-mCherry. Snímky byly pořízeny Mgr. Janou Váňovou

Tato diplomová práce se zaměřovala konkrétně na modifikace virových částic pomocí polyhistidinového peptidu. Souhrnem lze teď říci, že je možné pomocí kovalentní modifikace minoritního proteinu VP3 polyhistidinovým peptidem dosáhnout zvýšené efektivity přenosu částice do jádra, avšak pouhá ko-inkubace se v tomto případě nejvíce jeví jako optimální. Na druhou stranu, pokud by bylo cílem pouze dopravit obsah částice do cytosolu, je potěšujícím faktem výsledek frakcionace: VP-in s KH27K i částice pouze ko-inkubované s KH27K bylo možné ve zvýšené míře detekovat v cytosolu a lze se tedy domnívat, že došlo k efektivnímu úniku z endosomu. Z výsledků frakcionace se zdá, že díky KH27K dochází k asociaci s membránami a pravděpodobně destabilizaci endosomu, avšak určit, zda k tomu dochází předpovězeným mechanismem protonové houby na základě těchto výsledků nelze.

LAH4 naproti tomu vykazuje znatelné zvýšení transdukce proti kontrolním částicím v případě, kdy byl pouze ko-inkubován s PsV-VP1-VP3. Výsledky z laboratoře ukázaly, že za tímto efektem není okamžitá zvýšená internalizace do buněk (Váňová et al., 2020), ale pravděpodobně následné kroky v buňce. Lze se tedy domnívat, že zvýšená účinnost ko-inkubovaných částic s LAH4 spočívá v efektivním úniku z endosomu. Respektive, že k tomuto úniku dochází v případě, že je LAH4 s částicemi volně tak,

aby mohl v kyselém pH zaujímat konformaci, která mu dovolí narušit endosomální membránu. V případě ko-inkubace s částicemi také není jasné, zda je CPP s částicemi po celou dobu průchodu buňkou, či zda změnou pH v endosomu CPP disociují od částice pryč a pouze zprostředkují přenos.

V případě kovalentní modifikace částic peptidem R8 (VP-in-VP1+R8-tVP3) je možné dosáhnout nejvyšší efektivity přenosu virportérů-in do jádra v porovnání se všemi modifikovanými i nemodifikovanými částicemi, přímý endosomální únik u tohoto peptidu ve spojitosti s modifikací viru podobných částic popsán v literatuře doposud nebyl. Literatura se však zmiňuje o zvýšené účinnosti endosomálního úniku zprostředkovaného fúzí liposomů modifikovaných R8 s membránou endosomu proti liposomům modifikovaných K8 (8 molekul lysinu) (El-Sayed et al., 2008). U MPyV částic asociovaných s R8 dochází k přenosu pravděpodobně jiným způsobem, jedním by mohla být indukce fúze mezi jednotlivým endosomy a formování takzvaného multivezikulárního útvaru (shrnutí v LeCher et al., 2017). Druhý způsob, nad kterým lze uvažovat ale pravděpodobně pouze v případě pouze ko-inkubovaného R8, je vstup do buňky přímou translokací, a tedy vyhnutí se zachycení v endosomu a následný snazší přenos do jádra.

Ač si jednotlivé CPP žádají detailnější studium jejich působení v buňce, tak diplomová práce přinesla poznatky o fungování kovalentně modifikovaných a pouze ko-inkubovaných částicích odvozených od MPyV uvnitř buňky. Virportéry-in-KH27K, virportéry-in-R8 a PsV: LAH4 představují slibnou možnost zlepšení transdukčního potenciálu částic odvozených od MPyV pro efektivní dopravu terapeutických látek do buněk.

7 SOUHRN

Tento diplomový projekt představuje v ucelené podobě srovnávací studii, ve které byly virové částice modifikované polyhistidinovými peptidy porovnávány s virovými částicemi modifikovanými jinými CPP (R8, LAH4) a částicemi nemodifikovanými, a to v účinnosti dopravy heterologní DNA (pDNA) do jádra pro expresi reportérového genu a v intracelulární lokalizaci.

Prvním z dílčích cílů bylo připravit částice geneticky modifikované polyhistidinovým peptidem. Virportéry-in modifikované KH27K a později i peptidem LAH4 a R8 se úspěšně podařilo vyprodukovat a izolovat v dostatečném množství. Dále byly vedle modifikovaných částic produkovány i částice nemodifikované a to jak transfekcí v savčím systému (PsV), stejně jako virportéry-in, tak také v bakulovirovém expresním systému bac-to-bac (VLP-VP1).

Všechny izolované částice odvozené od viru byly charakterizovány pomocí TEM, přítomnost jednotlivých virových proteinů byla ověřena metodou SDS-PAGE s následnou přesávkou proteinů na nitrocelulózovou membránu a vizualizací imunobarvením pomocí protilátky. Hlavní kapsidový protein byl úspěšně detekován ve všech vzorcích, stejně jako minoritní protein VP3 pouze s výjimkou částic modifikovaných LAH4 peptidem (VP-in-VP1+VP3-LAH4 a VP-in-VP1+LAH4-tVP3).

Přítomnost a množství zabalené pDNA uvnitř částic bylo analyzováno a kvantifikováno metodou qPCR, která odhalila největší množství zabalené pDNA ve vzorku VP-in-VP1+VP3-KH27K a nejnižší u PsV-VP1-VP3 opt. Díky hodnotám zabalené pDNA bylo poté možné shodně nastavit luciferázový test, který přímo porovnal účinnost přenosu pDNA do jádra buněk pomocí virportérů-in a pseudovirionů. Luciferázový test potvrdil účinnost modifikace VP-in proti kontrolním částicím PsV-VP1-VP3 ve všech případech s výjimkou VP-in-VP1+VP3-LAH4, které nevykazovaly zvýšenou efektivitu transdukce.

Dalším cílem bylo ověřit, zda se částice modifikované KH27K dostávají v průběhu intracelulárního transportu do cytoplasmy. Dle rozdělení buněk pomocí jemné frakcionace bylo potvrzeno, že kovalentní modifikace částic odvozených od MPyV pomocí KH27K skutečně umožní transport viru do cytosolu, avšak přesný mechanismus úniku není možné touto metodou určit. V porovnání s ostatními VP-in bylo možné v cytosolu detekovat pouze VP-in s KH27K, avšak v případě ko-inkubace PsV a VLP s jednotlivými peptidy bylo možné detekovat zvýšené množství všech částic proti kontrolním neko-inkubovaným variantám částic napříč frakcemi.

Výsledky diplomové práce tak ukázaly, že nejefektivnějším vektorem pro přenos pDNA do jádra v porovnání s jednotlivými modifikovanými i nemodifikovanými částicemi jsou virportéry VP-in-VP1+R8-tVP3. Dále byla potvrzena přítomnost VP-in s KH27K v cytosolu, kam pravděpodobně

unikly z endosomálních váčků. Poslední zjištění diplomové práce poukazuje na efektivitu modifikace částic s LAH₄, u které se ukázalo, že kovalentní připojení LAH₄ k VP₃ proteinu nepřináší tak silný účinek, jako pouhá ko-inkubace LAH₄ peptidu s částicemi, při které bylo zjištěno až 40- násobné zvýšení efektivity transdukce do jádra proti kontrolním částicím.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamec, T., Palková, Z., Velková, K., Štokrová, J., & Forstová, J. (2005). Point mutation in calcium-binding domain of mouse polyomavirus VP1 protein does not prevent virus-like particle formation, but changes VP1 interactions with *Saccharomyces cerevisiae* cell structures. *FEMS Yeast Research*, 5(4-5), 331-340. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.012>
- Alhakamy, N. A., Nigatu, A. S., Berkland, C. J., & Ramsey, J. D. (2013). Noncovalently associated cell-penetrating peptides for gene delivery applications. In *Therapeutic Delivery* (Vol. 4, Issue 6, pp. 741-757). NIH Public Access. <https://doi.org/10.4155/tde.13.44>
- Aljabali, A. A. A., Shukla, S., Lomonossoff, G. P., Steinmetz, N. F., & Evans, D. J. (2013). CPMV-DOX delivers. *Molecular Pharmaceutics*, 10(1), 3-10. <https://doi.org/10.1021/mp3002057>
- An, K., Paulsen, A. Q., Tilley, M. B., & Consigli, R. A. (2000). Use of electron microscopic and immunogold labeling techniques to determine polyomavirus recombinant VP1 capsid-like particles entry into mouse 3T6 cell nucleus. *Journal of Virological Methods*, 90(1), 91-97. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00219-6](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00219-6)
- An, Ke, Gillock, E. T., Sweat, J. A., Reeves, W. M., & Consigli, R. A. (1999). Printed in Great Britain Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins : analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. In *Journal of General Virology* (Vol. 80).
- Ashley, C. E., Carnes, E. C., Phillips, G. K., Durfee, P. N., Buley, M. D., Lino, C. A., Padilla, D. P., Phillips, B., Carter, M. B., Willman, C. L., Brinker, C. J., Caldeira, J. D. C., Chackerian, B., Wharton, W., & Peabody, D. S. (2011). Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano*, 5(7), 5729-5745. <https://doi.org/10.1021/nn201397z>
- Barondes, S. H., Cooper, D. N. W., Gitt, M. A., & Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 269, Issue 33, pp. 20807-20810). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31891-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31891-4)
- Barouch, D. H., & Harrison, S. C. (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology*, 68(6), 3982-3989. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.6.3982-3989.1994>
- Bayer, L., Gümpel, J., Hause, G., Müller, M., & Grunwald, T. (2018). Non-human papillomaviruses for gene delivery in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198996>
- Bechinger, B. (1996). Towards membrane protein design: PH-sensitive topology of histidine-containing polypeptides. *Journal of Molecular Biology*, 263(5), 768-775. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0614>
- Behr, J.-P. (n.d.). 34 CHIMIA 5/ (1997) Nr. 1/2 (Jonuor/Februor) The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit.
- Biabanikhankahdani, R., Alitheen, N. B. M., Ho, K. L., & Tan, W. S. (2016). PH-responsive virus-like nanoparticles with enhanced tumour-targeting ligands for cancer drug delivery. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37891>
- Biswas, S., Deshpande, P. P., Perche, F., Dodwadkar, N. S., Sane, S. D., & Torchilin, V. P. (2013). Octa-arginine-modified pegylated liposomal doxorubicin: An effective treatment strategy for non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, 335(1), 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.020>
- Borowiec, J. A., & Hurwitz, J. (1988). Localized melting and structural changes in the SV40 origin of replication induced by T-antigen. *The EMBO Journal*, 7(10), 3149-3158. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03182.x>
- Borowiec, M. A. J., Dean, F. B., Bullock, P. A., & Hurwitz, J. (1990). Binding and Unwinding-How T Antigen Engages the SV40 Origin of DNA Replication. In *Cell* (Vol. 60, pp. 161-164).
- Bouřa, E., Liebl, D., Špišek, R., Frič, J., Marek, M., Štokrová, J., Holáň, V., & Forstová, J. (2005). Polyomavirus

- EGFP-pseudocapsids: Analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Letters*, 579(29), 6549–6558. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.062>
- Buch, M. H. C., Liaci, A. M., O'Hara, S. D., Garcea, R. L., Neu, U., & Stehle, T. (2015). Structural and Functional Analysis of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Establish the Determinants of Ligand Recognition and Pathogenicity. *PLoS Pathogens*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005104>
- Buck, C. B., Doorslaer, K. Van, Peretti, A., Geoghegan, E. M., Tisza, M. J., An, P., Katz, J. P., Pipas, J. M., McBride, A. A., Camus, A. C., McDermott, A. J., Dill, J. A., Delwart, E., Ng, T. F. F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D. V., & Varsani, A. (2016). The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathogens*, 12(4), 1005574. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005574>
- Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2004). Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. *Journal of Virology*, 78(2), 751–757. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.751-757.2004>
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., & Garcia, M.-I. (2003). $\alpha 4\beta 1$ Integrin Acts as a Cell Receptor for Murine Polyomavirus at the Postattachment Level. *Journal of Virology*, 77(7), 3913–3921. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.7.3913-3921.2003>
- Chang, D., Haynes, J. I., Brady, J. N., & Consigli, R. A. (1992). The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology*, 189(2), 821–827. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90615-V](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90615-V)
- Chen, Q. R., Zhang, L., Luther, P. W., & Mixson, A. J. (2002). Optimal transfection with the HK polymer depends on its degree of branching and the pH of endocytic vesicles. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1338–1345. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1338>
- Chen, X. S., Stehle, T., & Harrison, S. C. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO Journal*, 17(12), 3233–3240. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3233>
- Cho, M., Kim, H., & Son, H. S. (2019). Codon usage patterns of LT-Ag genes in polyomaviruses from different host species. *Virology Journal*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1245-2>
- Chou, S. T., Hom, K., Zhang, D., Leng, Q., Tricoli, L. J., Hustedt, J. M., Lee, A., Shapiro, M. J., Seog, J., Kahn, J. D., & Mixson, A. J. (2014). Enhanced silencing and stabilization of siRNA polyplexes by histidine-mediated hydrogen bonds. *Biomaterials*, 35(2), 846–855. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.019>
- Chuan, Y. P., Lua, L. H. L., & Middelberg, A. P. J. (2008). High-level expression of soluble viral structural protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 134(1–2), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.12.004>
- Crémisi, C., Pignatti, P. F., & Yaniv, M. (1976). Random location and absence of movement of the nucleosomes on SV 40 nucleoprotein complex isolated from infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73(3), 548–554. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90845-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90845-7)
- de Castro, I. F., Tenorio, R., & Risco, C. (2021). Virus Factories. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 495–500). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814515-9.00001-1>
- Debeljak, N., Feldman, L., Davis, K. L., Komel, R., & Sytkowski, A. J. (2006). Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. *Analytical Biochemistry*, 359(2), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.017>
- Delos, S. E., Montross, L., Moreland, R. B., & Garcea, R. L. (1993). Expression of the polyomavirus vp2 and vp3 proteins in insect cells: Coexpression with the major capsid protein vp1 alters vp2/vp3 subcellular localization. *Virology*, 194(1), 393–398. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1274>
- Deshpande, P., Jhaveri, A., Pattni, B., Biswas, S., & Torchilin, V. P. (2018). Transferrin and octaarginine modified dual-functional liposomes with improved cancer cell targeting and enhanced intracellular delivery for the treatment of ovarian cancer. *Drug Delivery*, 25(1), 517–532. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1435747>
- Dill, J. A., Ng, T. F. F., & Camus, A. C. (2016). Complete sequence of the smallest polyomavirus genome, giant

- guitarfish (*Rhynchobatus djiddensis*) polyomavirus 1. *Genome Announcements*, 4(3).
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00391-16>
- Du Rietz, H., Hedlund, H., Wilhelmson, S., Nordenfelt, P., & Wittrup, A. (2020). Imaging small molecule-induced endosomal escape of siRNA. *Nature Communications*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15300-1>
- Ehlers, Anoh, Salem, B., Broll, Couacy-Hymann, Fischer, Gedvilaite, Ingenhütt, Liebmann, Martin, Mossoun, Mugisha, Muyembe-Tamfum, Pauly, Val, Preugschas, Richter, Schubert, Szentiks, ... Calvignac-Spencer. (2019). Novel Polyomaviruses in Mammals from Multiple Orders and Reassessment of Polyomavirus Evolution and Taxonomy. *Viruses*, 11(10), 930. <https://doi.org/10.3390/v11100930>
- El-Sayed, A., Khalil, I. A., Kogure, K., Futaki, S., & Harashima, H. (2008). Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 23450–23461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709387200>
- Erickson, K. D., Bouchet-Marquis, C., Heiser, K., Szomolanyi-Tsuda, E., Mishra, R., Lamothe, B., Hoenger, A., & Garcea, R. L. (2012). Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells. *PLoS Pathogens*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002630>
- Eriksson, I., Wäster, P., & Öllinger, K. (2020). Restoration of lysosomal function after damage is accompanied by recycling of lysosomal membrane proteins. *Cell Death and Disease*, 11(5), 370. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2527-8>
- Fadzen, C. M., Holden, R. L., Wolfe, J. M., Choo, Z. N., Schissel, C. K., Yao, M., Hanson, G. J., & Pentelute, B. L. (2019). Chimeras of Cell-Penetrating Peptides Demonstrate Synergistic Improvement in Antisense Efficacy. *Biochemistry*, 58(38), 3980–3989. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00413>
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., & Moore, P. S. (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, 319(5866), 1096–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1152586>
- Ferrer-Mirallès, N., Corchero, J. L., Kumar, P., Cedano, J. A., Gupta, K. C., Villaverde, A., & Vazquez, E. (2011). Biological activities of histidine-rich peptides; merging biotechnology and nanomedicine. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 10, Issue 1, p. 101). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-101>
- Finch, J. T., & Crawford, L. V. (1975). Structure of Small DNA-Containing Animal Viruses. In *Structure and Assembly* (pp. 119–154). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2709-7_2
- Fluck, M. M., & Schaffhausen, B. S. (2009). Lessons in Signaling and Tumorigenesis from Polyomavirus Middle T Antigen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(3), 542–563. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00009-09>
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palková, Z., Strauss, M., & Griffin, B. E. (1995). Polyoma Virus Pseudocapsids as Efficient Carriers of Heterologous DNA into Mammalian Cells. *Human Gene Therapy*, 6(3), 297–306. <https://doi.org/10.1089/hum.1995.6.3-297>
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A. J., Dilworth, S. M., Beard, S., & Griffin, B. E. (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology*, 67(3), 1405–1413. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.3.1405-1413.1993>
- Fraiberk, M., Hájková, M., Krulová, M., Kojzarová, M., Drda Morávková, A., Pšikal, I., & Forstová, J. (2017). Exploitation of stable nanostructures based on the mouse polyomavirus for development of a recombinant vaccine against porcine circovirus 2. *PLoS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184870>
- Frankel, A. D., & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), 1189–1193. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2)
- Fretz, M. M., Penning, N. A., Al-Taei, S., Futaki, S., Takeuchi, T., Nakase, I., Storm, G., & Jones, A. T. (2007). Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells. *Biochemical Journal*, 403(2), 335–342. <https://doi.org/10.1042/BJ20061808>

- Futaki, S., Nakase, I., Tadokoro, A., Takeuchi, T., & Jones, A. T. (2007). Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, 35(4), 784–787. <https://doi.org/10.1042/BST0350784>
- Futaki, Shiroh, Goto, S., & Sugiura, Y. (2003). Membrane permeability commonly shared among arginine-rich peptides. *Journal of Molecular Recognition*, 16(5), 260–264. <https://doi.org/10.1002/jmr.635>
- Futaki, Shiroh, Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., & Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5836–5840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007540200>
- Gan, B. K., Yong, C. Y., Ho, K. L., Omar, A. R., Alitheen, N. B., & Tan, W. S. (2018). Targeted Delivery of Cell Penetrating Peptide Virus-like Nanoparticles to Skin Cancer Cells. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26749-y>
- Garcea, R. L., Salunke, D. M., & Caspar, D. L. D. (1987). Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature*, 329(6134), 86–87. <https://doi.org/10.1038/329086a0>
- Geiger, R., Andrichske, D., Friebe, S., Herzog, F., Luisoni, S., Heger, T., & Helenius, A. (2011). BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nature Cell Biology*, 13(11), 1305–1314. <https://doi.org/10.1038/ncb2339>
- Gerstweiler, L., Billakanti, J., Bi, J., & Middelberg, A. (2021). Comparative evaluation of integrated purification pathways for bacterial modular polyomavirus major capsid protein VP1 to produce virus-like particles using high throughput process technologies. *Journal of Chromatography A*, 1639, 461924. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461924>
- Ghosh, S., & Banerjee, M. (2021). A smart viral vector for targeted delivery of hydrophobic drugs. *Scientific Reports*, 11(1), 7030. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86198-y>
- Gilbert, J., Ou, W., Silver, J., & Benjamin, T. (2006). Downregulation of Protein Disulfide Isomerase Inhibits Infection by the Mouse Polyomavirus. *Journal of Virology*, 80(21), 10868–10870. <https://doi.org/10.1128/jvi.01117-06>
- Gillock, E. T., Rottinghaus, S., Chang, D., Cai, X., Smiley, S. A., An, K., & Consigli, R. A. (1997). Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *Journal of Virology*, 71(4), 2857–2865. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2857-2865.1997>
- Giorda, K. M., Raghava, S., Zhang, M. W., & Hebert, D. N. (2013). The viroporin activity of the minor structural proteins VP2 and VP3 is required for SV40 propagation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2510–2520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428425>
- Gonçalves, E., Kitas, E., & Seelig, J. (2005). Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: Structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry*, 44(7), 2692–2702. <https://doi.org/10.1021/bio48046i>
- Gourlie, B. B., Krauss, M. R., Buckler-White, A. J., Benbow, R. M., & Pigiet, V. (1981). Polyoma virus minichromosomes: a soluble in vitro replication system. *Journal of Virology*, 38(3), 805–814. <https://doi.org/10.1128/jvi.38.3.805-814.1981>
- Green, M., Ishino, M., & Loewenstein, P. M. (1989). Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: Identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell*, 58(1), 215–223. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90417-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90417-0)
- Griffith, J. P., Griffith, D. L., Rayment, I., Murakami, W. T., & Caspar, D. L. D. (1992). Inside polyomavirus at 25-Å resolution. *Nature*, 355(6361), 652–654. <https://doi.org/10.1038/355652a0>
- Gross, L. (1953). A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 83(2), 414–421. <https://doi.org/10.3181/00379727-83-20376>

- Hanittinan, O., Oo, Y., Chaotham, C., Rattanapisit, K., Shanmugaraj, B., & Phoolcharoen, W. (2020). Expression optimization, purification and in vitro characterization of human epidermal growth factor produced in *Nicotiana benthamiana*. *Biotechnology Reports*, 28, e00524. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00524>
- Hare, J. D., & Chan, J. C. (1968). Role of hydrogen and disulfide bonds in polyoma capsid structure. *Virology*, 34(3), 481–491. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(68\)90068-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(68)90068-8)
- Haynes, J. I., Chang, D., & Consigli, R. A. (1993). Mutations in the putative calcium-binding domain of polyomavirus VP1 affect capsid assembly. *Journal of Virology*, 67(5).
- He, J., Xu, S., & James Mixson, A. (2020). The multifaceted histidine-based carriers for nucleic acid delivery: Advances and challenges. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1–31). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080774>
- Herce, H. D., Garcia, A. E., Litt, J., Kane, R. S., Martin, P., Enrique, N., Rebolledo, A., & Milesi, V. (2009). Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophysical Journal*, 97(7), 1917–1925. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.066>
- Hieu, N. T., Kim, K. H., Janowicz, Z., & Timmermans, I. (2002). Comparative efficacy, safety and immunogenicity of Hepavax-Gene and Engerix-B, recombinant hepatitis B vaccines, in infants born to HBsAg and HBeAg positive mothers in Vietnam: An assessment at 2 years. *Vaccine*, 20(13–14), 1803–1808. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00518-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00518-7)
- Hirsch, H. H., Kardas, P., Kranz, D., & Leboeuf, C. (2013). The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications. *APMIS*, 121(8), 685–727. <https://doi.org/10.1111/apm.12128>
- Hirsch, H. H., Knowles, W., Dickenmann, M., Passweg, J., Klimkait, T., Mihatsch, M. J., & Steiger, J. (2002). Prospective Study of Polyomavirus Type BK Replication and Nephropathy in Renal-Transplant Recipients. *New England Journal of Medicine*, 347(7), 488–496. <https://doi.org/10.1056/nejmoa020439>
- Horníková, L., Fraiberk, M., Man, P., Janovec, V., & Forstová, J. (2017). VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle. *FEBS Journal*, 284(2), 301–323. <https://doi.org/10.1111/febs.13977>
- Horníková, L., Žíla, V., Španielová, H., & Forstová, J. (2015). Mouse polyomavirus: Propagation, purification, quantification, and storage. *Current Protocols in Microbiology*, 2015, 14F.1.1–14F.1.26. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc14f01s38>
- Hou, H., Zhao, Y., Li, C., Wang, M., Xu, X., & Jin, Y. (2017). Single-cell pH imaging and detection for pH profiling and label-free rapid identification of cancer-cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01956-1>
- Huérano, S., Ryabchenko, B., Španielová, H., & Forstová, J. (2017). Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the <sc>ER</sc>. *The FEBS Journal*, 284(6), 883–902. <https://doi.org/10.1111/febs.14033>
- Huerfano, S., Žíla, V., Bouřa, E., Španielová, H., Štokrová, J., & Forstová, J. (2010). Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS Journal*, 277(5), 1270–1283. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07558.x>
- Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017–Recommendations. (2017). In *Vaccine* (Vol. 35, Issue 43, pp. 5753–5755). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.069>
- Hwang, H. S., Hu, J., Na, K., & Bae, Y. H. (2014). Role of polymeric endosomolytic agents in gene transfection: A comparative study of poly(l-lysine) grafted with monomeric l-histidine analogue and poly(l-histidine). *Biomacromolecules*, 15(10), 3577–3586. <https://doi.org/10.1021/bm500843r>
- Iacobucci, V., Di Giuseppe, F., Bui, T. T., Vermeer, L. S., Patel, J., Scherman, D., Kichler, A., Drake, A. F., & Mason, A. J. (2012). Control of pH responsive peptide self-association during endocytosis is required for effective

- gene transfer. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(5), 1332–1341. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.018>
- Inoue, T., & Tsai, B. (2011). A large and intact viral particle penetrates the endoplasmic reticulum membrane to reach the cytosol. *PLoS Pathogens*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002037>
- Iwasaki, T., Tokuda, Y., Kotake, A., Okada, H., Takeda, S., Kawano, T., & Nakayama, Y. (2015). Cellular uptake and in vivo distribution of polyhistidine peptides. *Journal of Controlled Release*, 210, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.268>
- Jiao, C. Y., Delaroche, D., Burlina, F., Alves, I. D., Chassaing, G., & Sagan, S. (2009). Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 33957–33965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056309>
- Kaczmarczyk, S. J., Sitaraman, K., Young, H. A., Hughes, S. H., & Chatterjee, D. K. (2011). Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41), 16998–17003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101874108>
- Kanesashi, S. N., Ishizu, K. I., Kawano, M. A., Han, S. I., Tomita, S., Watanabe, H., Kataoka, K., & Handa, H. (2003). Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies in vitro. *Journal of General Virology*, 84(7), 1899–1905. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19067-0>
- Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Plucienniczak, A., & Legocki, A. B. (1999). A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *The FASEB Journal*, 13(13), 1796–1799. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.13.1796>
- Kartenbeck, J., Stukenbrok, H., & Helenius, A. (1989). Endocytosis of Simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 109(6), 2721–2729. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.6.2721>
- Kean, J. M., Rao, S., Wang, M., & Garcea, R. L. (2009). Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathogens*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000363>
- Khalil, I. A., Kogure, K., Futaki, S., & Harashima, H. (2006). High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3544–3551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503202200>
- Kichler, A., Leborgne, C., Danos, O., & Bechinger, B. (2007). Characterization of the gene transfer process mediated by histidine-rich peptides. *Journal of Molecular Medicine*, 85(2), 191–201. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0119-4>
- Kichler, A., Leborgne, C., März, J., Danos, O., & Bechinger, B. (2003). Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1564–1568. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337677100>
- Kichler, A., Mason, A. J., & Bechinger, B. (2006). Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(3), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.005>
- Kim, W. J., Christensen, L. V., Jo, S., Yockman, J. W., Jeong, J. H., Kim, Y. H., & Kim, S. W. (2006). Cholesteryl Oligoarginine Delivering Vascular Endothelial Growth Factor siRNA Effectively Inhibits Tumor Growth in Colon Adenocarcinoma. *Molecular Therapy*, 14(3), 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.022>
- Kimura, S., Kawano, T., & Iwasaki, T. (2017). Short polyhistidine peptides penetrate effectively into Nicotiana tabacum-cultured cells and Saccharomyces cerevisiae cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 81(1), 112–118. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1234925>
- Kondow-Mcconaghy, H. M., Muthukrishnan, N., Erazo-Oliveras, A., Najjar, K., Juliano, R. L., & Pellois, J. P. (2020). Impact of the Endosomal Escape Activity of Cell-Penetrating Peptides on the Endocytic Pathway. *ACS Chemical Biology*, 15(9), 2355–2363. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00319>
- Krauss, M. R., & Benbow, R. M. (1981). Polyoma virus minichromosomes: associated DNA molecules. *Journal of*

- Virology*, 38(3), 815–825. <https://doi.org/10.1128/jvi.38.3.815-825.1981>
- Lam, J. K. W., Liang, W., Lan, Y., Chaudhuri, P., Chow, M. Y. T., Witt, K., Kudsiova, L., & Mason, A. J. (2012). Effective endogenous gene silencing mediated by pH responsive peptides proceeds via multiple pathways. *Journal of Controlled Release*, 158(2), 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.024>
- Langedijk, J. P. M., Olijhoek, T., & Meloen, R. H. (2005). Application, efficiency and cargo-dependence of transport peptides. *International Congress Series*, 1277, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.02.016>
- Langel, Ü. (2015). Cell-penetrating peptides: Methods and protocols. In *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2806-4>
- Lättig-Tünnemann, G., Prinz, M., Hoffmann, D., Behlke, J., Palm-Apergi, C., Morano, I., Herce, H. D., & Cardoso, M. C. (2011). Backbone rigidity and static presentation of guanidinium groups increases cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Nature Communications*, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms1459>
- Leavitt, A. D., Roberts, T. M., & Garcea, R. L. (1985). Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 260(23), 12803–12809. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)38948-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)38948-2)
- LeCher, J. C., Nowak, S. J., & McMurry, J. L. (2017). Breaking in and busting out: Cell-penetrating peptides and the endosomal escape problem. In *Biomolecular Concepts* (Vol. 8, Issues 3–4, pp. 131–141). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/bmc-2017-0023>
- Li, M., Delos, S. E., Montross, L., & Garcea, R. L. (1995). Polyomavirus VP1 phosphorylation: Coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in SF9 insect cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), 5992–5996. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5992>
- Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L., & Harrison, S. C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*, 354(6351), 278–284. <https://doi.org/10.1038/354278a0>
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., & Forstová, J. (2006). Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *Journal of Virology*, 80(9), 4610–4622. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.9.4610-4622.2006>
- Liew, M. W. O., Rajendran, A., & Middelberg, A. P. J. (2010). Microbial production of virus-like particle vaccine protein at gram-per-litre levels. *Journal of Biotechnology*, 150(2), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.010>
- Lilley, B. N., Gilbert, J. M., Ploegh, H. L., & Benjamin, T. L. (2006). Murine Polyomavirus Requires the Endoplasmic Reticulum Protein Derlin-2 To Initiate Infection. *Journal of Virology*, 80(17), 8739–8744. <https://doi.org/10.1128/jvi.00791-06>
- Liu, Y., Kim, Y. J., Ji, M., Fang, J., Siriwon, N., Zhang, L. I., & Wang, P. (2014). Enhancing gene delivery of adeno-associated viruses by cell-permeable peptides. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 1, 12. <https://doi.org/10.1038/mtm.2013.12>
- Lo, S. L., & Wang, S. (2008). An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials*, 29(15), 2408–2414. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.031>
- López-Laguna, H., Cubarsi, R., Unzueta, U., Mangues, R., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2019). mater Endosomal escape of protein nanoparticles engineered through humanized histidine-rich peptides. *Sci China Mater*, 2020(4), 644–653. <https://doi.org/10.1007/s40843-019-1231-y>
- Luo, Y., Han, Y., Hu, X., Yin, M., Wu, C., Li, Q., Chen, N., & Zhao, Y. (2019). Live-cell imaging of octaarginine-modified polymer dots via single particle tracking. *Cell Proliferation*, 52(2), e12556. <https://doi.org/10.1111/cpr.12556>

- Ma, D. X., Shi, N. Q., & Qi, X. R. (2011). Distinct transduction modes of arginine-rich cell-penetrating peptides for cargo delivery into tumor cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 419(1–2), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.001>
- Magnuson, B., Rainey, E. K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S., & Tsai, B. (2005). ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Molecular Cell*, 20(2), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.034>
- Mannová, P., & Forstová, J. (2003). Mouse Polyomavirus Utilizes Recycling Endosomes for a Traffic Pathway Independent of COPI Vesicle Transport. *Journal of Virology*, 77(3), 1672–1681. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.1672-1681.2003>
- Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B. E., & Forstová, J. (2002). Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology*, 83(9), 2309–2319. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-9-2309>
- Martens, T. F., Remaut, K., Demeester, J., De Smedt, S. C., & Braeckmans, K. (2014). Intracellular delivery of nanomaterials: How to catch endosomal escape in the act. In *Nano Today* (Vol. 9, Issue 3, pp. 344–364). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.04.011>
- Mayberry, C. L., Bond, A. C. S., Wilczek, M. P., Mehmood, K., & Maginnis, M. S. (2021). Sending mixed signals: polyomavirus entry and trafficking. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 47, pp. 95–105). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.02.004>
- Medina, D. L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampanato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J. A., Sardiello, M., Palmieri, M., Polishchuk, R., Puertollano, R., & Ballabio, A. (2011). Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Developmental Cell*, 21(3), 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.016>
- Meng, Y., Sun, D., Qin, Y., Dong, X., Luo, G., & Liu, Y. (2021). Cell-penetrating peptides enhance the transduction of adeno-associated virus serotype 9 in the central nervous system. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 21, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.02.019>
- Meng, Z., Luan, L., Kang, Z., Feng, S., Meng, Q., & Liu, K. (2017). Histidine-enriched multifunctional peptide vectors with enhanced cellular uptake and endosomal escape for gene delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(1), 74–84. <https://doi.org/10.1039/c6tb02862d>
- Midoux, P., Kichler, A., Boutin, V., Maurizot, J. C., & Monsigny, M. (1998). Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjugate Chemistry*, 9(2), 260–267. <https://doi.org/10.1021/bc9701611>
- Moreland, R. B., Montross, L., & Garcea, R. L. (1991). Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *Journal of Virology*, 65(3), 1168–1176. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.3.1168-1176.1991>
- Moulay, G., Leborgne, C., Mason, A. J., Aisenbrey, C., Kichler, A., & Bechinger, B. (2017). Histidine-rich designer peptides of the LAH4 family promote cell delivery of a multitude of cargo. *Journal of Peptide Science*, 23(4), 320–328. <https://doi.org/10.1002/psc.2955>
- Mout, R., Ray, M., Tay, T., Sasaki, K., Yesilbag Tonga, G., & Rotello, V. M. (2017). General Strategy for Direct Cytosolic Protein Delivery via Protein-Nanoparticle Co-engineering. *ACS Nano*, 11(6), 6416–6421. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02884>
- Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., & Boissguerin, P. (2008). Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjugate Chemistry*, 19(12), 2363–2374. <https://doi.org/10.1021/bc800194e>
- Nakanishi, A., Li, P. P., Qu, Q., Jafri, Q. H., & Kasamatsu, H. (2007). Molecular dissection of nuclear entry-competent SV40 during infection. *Virus Research*, 124(1–2), 226–230. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.10.001>
- Nigatu, A. S., Vupputuri, S., Flynn, N., Neely, B. J., & Ramsey, J. D. (2013). Evaluation of Cell-Penetrating

- Peptide/Adenovirus Particles for Transduction of CAR-Negative Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(6), 1981–1993. <https://doi.org/10.1002/jps.23556>
- Nigatu, A. S., Vupputuri, S., Flynn, N., & Ramsey, J. D. (2015). Effects of cell-penetrating peptides on transduction efficiency of PEGylated adenovirus. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 71, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.02.015>
- Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 19, Issue 1, p. 59). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>
- Padgett, B. L., Zurhein, G. M., Walker, D. L., Eckroade, R. J., & Dessel, B. H. (1971). CULTIVATION OF PAPOVA-LIKE VIRUS FROM HUMAN BRAIN WITH PROGRESSIVE MULTIFOCAL LEUCOENCEPHALOPATHY. *The Lancet*, 297(7712), 1257–1260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91777-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91777-6)
- Patel, S. G., Sayers, E. J., He, L., Narayan, R., Williams, T. L., Mills, E. M., Allemann, R. K., Luk, L. Y. P., Jones, A. T., & Tsai, Y. H. (2019). Cell-penetrating peptide sequence and modification dependent uptake and subcellular distribution of green florescent protein in different cell lines. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42456-8>
- Pattinson, D. J., Apte, S. H., Wibowo, N., Chuan, Y. P., Rivera-Hernandez, T., Groves, P. L., Lua, L. H., Middelberg, A. P. J., & Doolan, D. L. (2019). Chimeric murine polyomavirus virus-like particles induce Plasmodium antigen-specific CD8+ T cell and antibody responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(JUN), 215. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00215>
- Pei, D., & Buyanova, M. (2019). Overcoming Endosomal Entrapment in Drug Delivery. In *Bioconjugate Chemistry* (Vol. 30, Issue 2, pp. 273–283). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00778>
- Peters, D. K., Erickson, K. D., & Garcea, R. L. (2020). Live cell microscopy of murine polyomavirus subnuclear replication centers. *Viruses*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/v12101123>
- Qian, C., Liu, X., Xu, Q., Wang, Z., Chen, J., Li, T., Zheng, Q., Yu, H., Gu, Y., Li, S., & Xia, N. (2020). Recent progress on the versatility of virus-like particles. In *Vaccines* (Vol. 8, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010139>
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K. J., & Tsai, B. (2009). A Lipid Receptor Sorts Polyomavirus from the Endolysosome to the Endoplasmic Reticulum to Cause Infection. *PLoS Pathogens*, 5(6), e1000465. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000465>
- Qian, Z., Martyna, A., Hard, R. L., Wang, J., Appiah-Kubi, G., Coss, C., Phelps, M. A., Rossman, J. S., & Pei, D. (2016). Discovery and Mechanism of Highly Efficient Cyclic Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry*, 55(18), 2601–2612. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00226>
- Ramakrishna, S., Kwaku Dad, A. B., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S. K., & Kim, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Research*, 24(6), 1020–1027. <https://doi.org/10.1101/gr.171264.113>
- Rehman, Z. U., Hoekstra, D., & Zuhorn, I. S. (2013). Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: Real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. *ACS Nano*, 7(5), 3767–3777. <https://doi.org/10.1021/nn3049494>
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., & Forstová, J. (2001). Caveolae Are Involved in the Trafficking of Mouse Polyomavirus Virions and Artificial VP1 Pseudocapsids toward Cell Nuclei. *Journal of Virology*, 75(22), 10880–10891. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.22.10880-10891.2001>
- Rothbard, J. B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P. L., Wender, P. A., & Khavari, P. A. (2000). Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nature Medicine*, 6(11), 1253–1257. <https://doi.org/10.1038/81359>

- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., & Anderson, R. G. W. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4), 673–682. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90143-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90143-Z)
- Rybak, S. L., Lanni, F., & Murphy, R. F. (1997). Theoretical Considerations on the Role of Membrane Potential in the regulation of endosomal pH. *Biophysical Journal*, 73(2), 674–687. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78102-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78102-5)
- Rybak, S. L., & Murphy, R. F. (1998). Primary cell cultures from murine kidney and heart differ in endosomal pH. *Journal of Cellular Physiology*, 176(1), 216–222. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199807\)176:1<216::AID-JCP23>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<216::AID-JCP23>3.0.CO;2-3)
- Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R., & Benjamin, T. (1993). Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology*, 192(1), 142–153. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1016>
- Sakamoto, K., Morishita, T., Aburai, K., Ito, D., Imura, T., Sakai, K., Abe, M., Nakase, I., Futaki, S., & Sakai, H. (2021). Direct entry of cell-penetrating peptide can be controlled by maneuvering the membrane curvature. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79518-1>
- Salunke, D M, Caspar, D. L., & Garcea, R. L. (1989). Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophysical Journal*, 56(5), 887–900. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82735-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82735-3)
- Salunke, Dinakar M., Caspar, D. L. D., & Garcea, R. L. (1986). Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell*, 46(6), 895–904. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90071-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90071-1)
- Sánchez-Navarro, M. (2021). Advances in peptide-mediated cytosolic delivery of proteins. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 171, pp. 187–198). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.02.003>
- Sánchez-Rodríguez, S. P., Münch-Anguiano, L., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Mora-Pale, M., Dordick, J. S., & Bustos-Jaimes, I. (2012). Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie*, 94(3), 870–878. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.12.006>
- Schumacher, J., Bacic, T., Staritzbichler, R., Daneschdar, M., Klamp, T., Arnold, P., Jäggle, S., Türeci, Ö., Markl, J., & Sahin, U. (2018). Enhanced stability of a chimeric hepatitis B core antigen virus-like-particle (HBcAg-VLP) by a C-terminal linker-hexahistidine-peptide. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0363-0>
- Seth, A., Kong, I. G., Lee, S. H., Yang, J. Y., Lee, Y. S., Kim, Y., Wibowo, N., Middelberg, A. P. J., Lua, L. H. L., & Kweon, M. N. (2016). Modular virus-like particles for sublingual vaccination against group A streptococcus. *Vaccine*, 34(51), 6472–6480. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.008>
- Shete, H. K., Prabhu, R. H., & Patravale, V. B. (2014). Endosomal escape: A bottleneck in intracellular delivery. In *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 460–474). <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9082>
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 14, Issue 1, p. 41). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
- Slilaty, S. N., Berns, K. I., & Aposhian, H. V. (1982). Polyoma-like particle: characterization of the DNA encapsidated in vitro by polyoma empty capsids. *Journal of Biological Chemistry*, 257(11), 6571–6575. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)65180-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)65180-8)
- Smith, A. E., Lilie, H., & Helenius, A. (2003). Ganglioside-dependent cell attachment and endocytosis of murine polyomavirus-like particles. *FEBS Letters*, 555(2), 199–203. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01220-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01220-1)
- Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R., & Such, G. K. (2019). The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. In *Bioconjugate Chemistry* (Vol. 30, Issue 2, pp. 263–272). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00732>

- Soldatova, I., Prilepskaja, T., Abrahamyan, L., Forstová, J., & Huérfano, S. (2018). Interaction of the mouse polyomavirus capsid proteins with importins is required for efficient import of viral DNA into the cell nucleus. *Viruses*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/v10040165>
- Somiya, M., & Kuroda, S. (2020). Virus-mimicking nanocarriers for the intracellular delivery of therapeutic biomolecules. In *Nanomedicine* (Vol. 15, Issue 12, pp. 1163–1165). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0078>
- Španielová, H., Fraiberk, M., Suchanová, J., Soukup, J., & Forstová, J. (2014). The encapsidation of polyomavirus is not defined by a sequence-specific encapsidation signal. *Virology*, 450–451, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.010>
- Stahl, H., Dröge, P., & Knippers, R. (1986). DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *The EMBO Journal*, 5(8), 1939–1944. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04447.x>
- Stehle, T., & Harrison, S. C. (1996). Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure*, 4(2), 183–194. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00021-4)
- Streuli, C. H., & Griffin, B. E. (1987). Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature*, 326(6113), 619–622. <https://doi.org/10.1038/326619a0>
- Tanaka, Y., Nanasato, Y., Omura, K., Endoh, K., Kawano, T., & Iwasaki, T. (2021). Direct protein delivery into intact plant cells using polyhistidine peptides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbab055>
- Tekewe, A., Fan, Y., Tan, E., Middelberg, A. P. J., & Lua, L. H. L. (2017). Integrated molecular and bioprocess engineering for bacterially produced immunogenic modular virus-like particle vaccine displaying 18 kDa rotavirus antigen. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(2), 397–406. <https://doi.org/10.1002/bit.26068>
- Teunissen, E. A., De Raad, M., & Mastrobattista, E. (2013). Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 172, Issue 1, pp. 305–321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.026>
- Thiele, D. L., & Lipsky, P. E. (1990). Mechanism of L-leucyl-L-leucine methyl ester-mediated killing of cytotoxic lymphocytes: Dependence on a lysosomal thiol protease, dipeptidyl peptidase I, that is enriched in these cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(1), 83–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.83>
- Tsai, B., Gilbert, J. M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T. L., & Rapoport, T. A. (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO Journal*, 22(17), 4346–4355. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg439>
- Tsai, B., & Qian, M. (2010). Cellular Entry of Polyomaviruses. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 343, pp. 177–194). Curr Top Microbiol Immunol. https://doi.org/10.1007/82_2010_38
- Váňová, J., Hejtmánková, A., Kalbáčová, M. H., & Španielová, H. (2019). The utilization of cell-penetrating peptides in the intracellular delivery of viral nanoparticles. In *Materials* (Vol. 12, Issue 7, p. 2671). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma12172671>
- Váňová, J., Hejtmánková, A., Suchanová, J. Ž., Sauerová, P., Forstová, J., Kalbáčová, M. H., & Španielová, H. (2020). Influence of cell-penetrating peptides on the activity and stability of virus-based nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 576. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.119008>
- Viscidi, R. P., Rollison, D. E., Sondak, V. K., Silver, B., Messina, J. L., Giuliano, A. R., Fulp, W., Ajidahun, A., & Rivanera, D. (2011). Age-specific seroprevalence of merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(10), 1737–1743. <https://doi.org/10.1128/CVI.05175-11>
- Vivès, E., Brodin, P., & Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), 16010–16017. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>

- Walczak, C. P., & Tsai, B. (2011). A PDI Family Network Acts Distinctly and Coordinately with ERp29 To Facilitate Polyomavirus Infection. *Journal of Virology*, 85(5), 2386–2396. <https://doi.org/10.1128/jvi.01855-10>
- Wang, C., Zhao, T., Li, Y., Huang, G., White, M. A., & Gao, J. (2017). Investigation of endosome and lysosome biology by ultra pH-sensitive nanoprobes. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 113, pp. 87–96). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.08.014>
- Wang, F., Widejko, R. G., Yang, Z., Nguyen, K. T., Chen, H., Fernando, L. P., Christensen, K. A., & Anker, J. N. (2012). Surface-enhanced Raman scattering detection of pH with silica-encapsulated 4-mercaptobenzoic acid-functionalized silver nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 84(18), 8013–8019. <https://doi.org/10.1021/ac3018179>
- Wittrup, A., Ai, A., Liu, X., Hamar, P., Trifonova, R., Charisse, K., Manoharan, M., Kirchhausen, T., & Lieberman, J. (2015). Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nature Biotechnology*, 33(8), 870–876. <https://doi.org/10.1038/nbt.3298>
- Wolf, J., Aisenbrey, C., Harmouche, N., Raya, J., Bertani, P., Voievoda, N., Süss, R., & Bechinger, B. (2017). pH-Dependent Membrane Interactions of the Histidine-Rich Cell-Penetrating Peptide LAH4-L1. *Biophysical Journal*, 113(6), 1290–1300. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.053>
- Yao, J., Ma, Y., Zhang, W., Li, L., Zhang, Y., Zhang, L., Liu, H., Ni, J., & Wang, R. (2017). Design of new acid-activated cellpenetrating peptides for tumor drug delivery. *PeerJ*, 2017(6), e3429. <https://doi.org/10.7717/peerj.3429>
- Zackova Suchanova, J., Hejtmankova, A., Neburkova, J., Cigler, P., Forstova, J., Spanielova, H., & Spanielova, H. (2020). The Protein Corona Does Not Influence Receptor-Mediated Targeting of Virus-like Particles. *Bioconjugate Chemistry*, 31(5), 1575–1585. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00240>
- Zaro, J. L., Fei, L., & Shen, W. C. (2012). Recombinant peptide constructs for targeted cell penetrating peptide-mediated delivery. *Journal of Controlled Release*, 158(3), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.039>

9 PŘÍLOHY PRÁCE

Produkované VP-in	pomocný plasmid 1	pomocný plasmid 2	reportérový plasmid	expresní systém	způsob izolace
VP-in-VP1+KH27K-tVP3	pWP_VP1_KH27K-tVP3		pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+KH27K-tVP3+VP2	pWP_VP1_KH27K-tVP3	pH2-VP1	pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+VP3-KH27K	pWP_VP1_VP3-KH27K		pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+VP3-KH27K opt.	pWP_VP1_VP3-KH27K		pGL3- control	savčí	Optiprep - ultracentrifugace v jodaxilovém gradientu
VP-in-VP1+VP3-KH27K+VP2	pWP_VP1_VP3-KH27K	pH2-VP1	pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+LAH4-tVP3	pWP_VP1_LAH4-tVP3		pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+LAH4-tVP3+VP2	pWP_VP1_LAH4-tVP3	pH2-VP1	pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+VP3-LAH4	pWP_VP1_VP3-LAH4		pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+VP3-LAH4+VP2	pWP_VP1_VP3-LAH4	pH2-VP1	pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+R8-tVP3	pWP_VP1_R8-tVP3		pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+R8-tVP3+VP2	pWP_VP1_R8-tVP3	pH2-VP1	pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+VP3-R8	pWP_VP1_VP3-R8		pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
VP-in-VP1+VP3-R8+VP2	pWP_VP1_VP3-R8	pH2-VP1	pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
Produkované PsV	pomocný plasmid 1	pomocný plasmid 1	reportérový plasmid	expresní systém	způsob izolace
PsV-VP1	pWP_VP1		pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
PsV-VP1+VP2+VP3	pH2-VP1	pH3β	pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
PsV-VP1+VP3	pWP_VP1	pH3β	pGL3- control	savčí	ultracentrifugace ve dvoustupňovém gradientu CsCl
PsV-VP1+VP3 opt.	pWP_VP1	pH3β	pGL3- control	savčí	Optiprep - ultracentrifugace v jodaxilovém gradientu
Produkované VLP				expresní systém	způsob izolace
VLP-VP1				bakulovirový	ultracentrifugace v gradientu CsCl

Tabulka 12: Tabulka všech produkovaných částic odvozených od MPyV v rámci diplomového projektu